Aus dem Institut für Gerichtliche Medizin der Universität Tübingen
Ehem. Direktor: Professor Dr. med. Georg Schmidt

Untersuchungen zum Nachweis von Tegretal® (5-Carbamyl-5-H-dibenzo-(b, f)azepin) und seinen Metaboliten im menschlichen Harn

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Hans Rooschüz
aus Gaildorf

1969

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Aus dem Institut für Gerichtliche Medizin der Universität Tübingen
Ehem. Direktor: Professor Dr. med. Georg Schmidt

Untersuchungen zum Nachweis von Tegretal® (5-Carbamyl-5-H-dibenzo-(b, f)azepin) und seinen Metaboliten im menschlichen Harn

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Hans Rooschüz
aus Gaildorf

1969

Dekan: Professor Dr. med. W. Graumann

1. Berichterstatter: Professor Dr. med. G. Schmidt
2. Berichterstatter: Professor Dr. med. F. Lembeck

FOTODRUCK PRÄZIS Barbara v. Spangenberg KG · Tübingen

Herrn Professor Dr.med. Gg. Schmidt möchte ich für die Überlassung des Themas und die großzügige Förderung herzlich danken.

Mein weiterer Dank gilt Herrn Dr. rer. nat. J. Bösche für die zahlreichen Anregungen.

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

I. EINLEITUNG

A) Bedeutung von Tegretal in der forensisch-toxikologischen Analyse und Zielsetzung der Arbeit 1

B) Pharmakologische und toxikologische Eigenschaften, Wirkungsart, Resorption, Verteilung und Metabolismus von Tegretal 2

II. EIGENE VERSUCHE

A) Chemische und physikalische Eigenschaften von Tegretal 7

1. Löslichkeit 7
2. Chromatographisches Verhalten

a) Papierchromatographie 7
b) Dünnschichtchromatographie 8

3. Nachweisbarkeit

a) Papierchromatographie 8
b) Dünnschichtchromatographie 8

4. Vakuumsublimation 9
5. Lichtabsorption im Ultraviolett 11
6. Schmelzpunkt 12
7. IR-Spektrum 13

B) Bestimmung von Eichkurven 15

1. Reinsubstanz 16
2. Papierchromatographie

a) Reinsubstanz nach chromatographischer Trennung 16
b) Zusatzversuche zu Wasser 16
c) Zusatzversuche zu Leerharn 17

Seite

3. Dünnschichtchromatographie 18

a) Reinsubstanz nach dünnschicht-chromatographischer Trennung 19

b) Zusatzversuche zu Leerharn 19

C) Hauptversuche mit Harn nach Einnahme von Tegretal 21

1. 1.Selbstversuch 22

a) Nachweis von Tegretal und seinen Metaboliten 22

b) Quantitative Bestimmung der Tegretalausscheidung 29

c) Ausscheidung der Tegretalmetaboliten I, II und III 3o

2. 2.Selbstversuch 32

a) Quantitative Bestimmung der Tegretalausscheidung 33

b) Ausscheidung der Tegretalmetaboliten I, II und IV 35

3. Patienten unter Tegretaldauermedikation 37

a) Ausscheidung von Tegretal 39

b) Ausscheidung der Tegretalmetaboliten I - V 39

D) Isolierung von Tegretal und seinen Metaboliten aus Harn und Versuche zur Identifizierung

1. Tegretal 42

a) Isolierung aus Harn 42

b) Kristalloptische Untersuchung des Vakuumsublimats 44

c) Schmelzpunkt 45

Seite

2. Metabolit I 45

a) Isolierung aus Harn 46

b) Kristalloptische Untersuchung des Vakuumsublimats 46

3. Metabolit II 47

4. Metabolit III 48

5. Zusammenfassung der Versuche zur Isolierung und Identifizierung von Tegretal und seinen Metaboliten aus Harn 49

E) Untersuchung eines möglichen Abbauproduktes von Tegretal und Synthese von Vergleichssubstanzen durch Hydrolyse von Tegretal 5o

1. Stilben 51

2. Hydrolyse von Tegretal 51

a) Vorgang und Nachweis der entstehenden Substanzen 52

b) Substanz bei Rf-Wert o,95 (Iminostilben) Identifizierung durch Vakuumsublimation, Schmelzpunkt, UV-Absorptionsspektrum, IR- und Massenspektrum 53

c) Substanz bei Rf-Wert o,83 55

d) Substanz bei Rf-Wert o,68 56

III. DISKUSSION DER VERSUCHSERGEBNISSE 57

IV. ZUSAMMENFASSUNG 64

V. LITERATURVERZEICHNIS 66

I. EINLEITUNG

A. Bedeutung von Tegretal in der forensisch-toxikologischen Analyse und Zielsetzung der Arbeit:

Tegretal®, mit dem chemischen Namen 5-Carbamyl-5 H-dibenzo-(b,f)azepin und der internationalen Kurzbezeichnung Carbamazepin (im folgenden Tegretal), wurde von SCHINDLER (1956) synthetisiert. Seit 1959 ist es als Antiepileptikum in klinischem Gebrauch und seit 1.9.1964 in Deutschland im Handel.+) Seine Indikation wurde auf die Trigeminusneuralgie ausgedehnt und neuerdings findet es auch Anwendung als Therapeutikum bei verschiedenen innersekretorischen Störungen.

Die Ausbreitung dieses Medikamentes steigert die Gefahr von akzidentellen oder suicidalen Vergiftungen, wie die zwei von HAGEN (1964; zit. HANEKE, 1966) und HAAS und LAUBICHLER (1967) beschriebenen Fälle zeigen. Deshalb ist eine sichere Identifizierung von Tegretal und seinen Metaboliten bei der gerichtsmedizinischen Untersuchung von Harnproben nötig.

Es gibt nur wenige Arbeiten, die sich mit der Trennung, Identifizierung und Harnausscheidung von Tegretal und seinen Metaboliten beschäftigen (BRAUNHOFER und JESCH, 1964; FÜHR, 1964; WEIST und ZICHA, 1967). Die Autoren kommen zudem zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen ihrer Ausscheidungsversuche, was Größe und Dauer betrifft.

In der vorliegenden Arbeit wird deshalb versucht, empfindliche Nachweismethoden für Tegretal und seine Metaboliten auszuarbeiten, über ihre Ausscheidungsverhältnisse eine Aussage zu machen und die Metaboliten zu charakterisieren.

+) Hersteller: J.R. Geigy AG., Basel (Schweiz); Pharmaherstellung und Vertrieb in Deutschland: Dr. Karl Thomae GmbH, Biberach (Riß).

B. Pharmakologische und toxikologische Eigenschaften, Wirkungsart, Resorption, Verteilung und Metabolismus von Tegretal

Übereinstimmend weisen HERNANDEZ-PEON (1962), BONDUELLE, BOUYGUES, SALLOU und CHEMALY (1962), LORGÉ (1962), BONDUELLE und SALLOU (1963), MÜLLER (1963), TCHIKALOFF und PENNETTI (1963), THEOBALD und KUNZ (1963), BONDUELLE, BOUYGUES und SALLOU (1964), GÜNTELBERG (1964), HAGEN und RICHTER (1964), JAKOBS (1964), SIGWALD, BONDUELLE, SALLOU, RAVERDY, PIOT und STEENBRUGGHE (1964), DAVIS (1964), HEINTEL (1965), MARTIN, MOVARREKHI und GISIGER (1965) auf den guten antikonvulsiven Effekt von Tegretal hin, der nach RETT (1962/63), PAKESCH (1963) und JONGMANS (1964) die herkömmlichen Mittel bei Temporallappenepilepsie - bzw. psychomotorischen Anfällen und bei Grand Mal übertrifft. BIRD, GRIFFIN, MIKLASZEWSKA und GALBRAITH (1966) allerdings stellen in einem kontrollierten Versuch nach der Methode von HANDLEY und STEWART (1952) fest, daß sich Tegretal in seiner Wirkung nicht signifikant von den herkömmlichen Antikonvulsiva unterscheidet. STEINBRECHER (1966) spricht dem Medikament sogar die schlechteste Wirkung bei psychomotorischen Anfällen zu. Petit Mal und Kombination Epilepsie-Idiotie sprechen dagegen schlecht an (KETZ, 1964), ebenso wie Absencen. Bei Pyknolepsien konnte keinerlei Wirkung erzielt werden (KRUEGER, 1964). Tegretal kann hier aber als therapeutische Grundlage verwendet werden (BRAUNHOFER, 1965). LORGÉ (1963) beobachtete, daß Grand Mal und auch Mischformen besser reagieren, wenn ein psychopathologisches Begleitsyndrom vorliegt, als wenn die Form rein vorkommt.

Es wird in der Literatur hervorgehoben, daß Tegretal nicht nur die Anzahl der Anfälle reduziert, sondern gleichzeitig epileptische Wesensveränderungen günstig beeinflußt. LUSTIG (1964) und ALNAES (1965)

machen diesen psychotropen Effekt sogar für die antikonvulsive Wirkung von Tegretal verantwortlich.

Vielen Autoren fiel die Paradoxie des EEG unter Tegretalmedikation auf, d.h. die Zunahme der Krampfpotentiale bei Abnahme der Anfälle, was HESS (1965) und HANEKE (1966) als Zeichen einer Überdosierung deuten.

Die erste Mitteilung von BLOM (1962), nach der Tegretal einen sehr guten Effekt bei der Behandlung der echten Trigeminusneuralgie hat, wurde von vielen Autoren bestätigt (TAYLOR, 1963; BLOM, 1963; LAPIERRE und THIRY, 1964; GERAUD, RASCOL, GLEIZES und BENAZET, 1964; PUOYANNE, LÉMAN , ARNÉ und COIFFU, 1964; SOULAIRAC und CHARPENTIER, 1965; FUCHS, 1965; JAHNKE und JAHNKE, 1965; HEYCK, 1965; BURKE, GRANT und SELBY, 1965; BECKER und BALSHÜSEMANN, 1965; AMOLS, 1966). Bei symptomatischen Neuralgien ist die Wirkung nicht immer sicher. WAROT, PETIT, DELANDTSHEER, ARNOTT und FOURLINNIE (1964) und BONDUELLE, HOUDART, SIGWALD, BOUYGUES und LORMEAU (1964) verwenden deshalb Tegretal als diagnostischen Test zur Unterscheidung von echten und symptomatischen Trigeminusneuralgien. VANDERFIELD (1964) macht aber bei allen zweifelhaften Neuralgien des Gesichts einen Therapieversuch mit Tegretal. Auch HEYCK (1967) fand bei symptomatischen Neuralgien eine sehr gute Wirkung. EKBOM (1966) berichtet von zwei Patienten mit lanzierenden Schmerzen bei Tabes dorsalis, die mit Tegretal innerhalb ein paar Tagen schmerzfrei wurden.

Nach KETZ (1967) hält die Wirkung von Tegretal bei der Trigeminusneuralgie nicht an. Ein Drittel der Patienten zeigte nach Langzeitbehandlung Rezidive. Bei der Behandlung der Epilepsie dagegen läßt die Wirkung nicht nach (LUSTIG, 1967).

Als weiteres Indikationsgebiet neben bestimmten zentralen Schmerzzuständen geben BRAUNHOFER, WEIST, ZICHA und SCHMIDT (1965) und BRAUNHOFER und ZICHA (1967) verschiedene innersekretorische Störungen an. Bei Diabetes insipidus werden die schweren Wasserhaushaltsstörungen weitgehend kompensiert,

auch Hirndruckzustände wie Morgagni-Syndrom oder kryptogenetische Stauungspapille werden normalisiert und bei Akromegalie kommt es neben der Beeinflussung etwaiger Hirndruckerscheinungen, Sehstörungen und anderer Kopfbeschwerden zur Rückbildung der vergrößerten Akren und Abnahme des Hirsutismus.

Als auffallende Tatsache wurde konstatiert, daß sich Tegretal vorzüglich zur Opiateentziehung, selbst nach monatelangem Opiategebrauch, eignete.

Im allgemeinen wird Tegretal gut vertragen, doch kann es zu Nebenerscheinungen in Form von Appetitlosigkeit, Übelkeit, Brechreiz, Akkomodationsstörungen, Ataxie, Somnolenz und allergischen Hauterscheinungen kommen, die aber nach Absetzen des Mittels alle wieder verschwinden. In seltenen Fällen wurden auch leichte, spontan remittierende Leukopenien festgestellt; SPILLANE (1964) beschreibt sogar einen Fall von aplastischer Anämie. Schließlich kamen mehrmals Zustände geistiger Verwirrung vor.

Über die Wirkungsart von Tegretal wurden bis jetzt nur Vermutungen geäußert. RETT (1962/63) schließt aus dem Wirkungshöhepunkt von Tegretal als Antiepileptikum zur Zeit der Pubertät und Präpubertät, daß Zusammenhänge mit dem endokrinen Wandlungsprozess des Pubertierenden bestehen. Bei dem guten Effekt auf die Trigeminusneuralgie handelt es sich nach KÖLE und ZISSER (1966) um eine Hemmung des Reflexgeschehens, die von HERNANDEZ-PEON (1965) sowohl im bulbären Bereich wie im Thalamus lokalisiert wird, und um eine Verminderung der neuromuskulären Reizübertragung. Nach den Beobachtungen von BRAUNHOFER und JESCH (1964) wirkt Tegretal über eine Beeinflussung der zentralen Osmoregulation, wobei es zu einer Regulierung des intrazerebralen Wasser- und Elektrolythaushalts und somit des intrakraniellen Druckes beiträgt. SCHEIFFARTH, WEIST und ZICHA (1966) meinen, daß die außerordentlich gute Liquorgängigkeit und der Nachweis des Pharmakons und einiger seiner Metaboliten im menschlichen Hirn

Hinweise für einen direkten Angriffspunkt dieser Substanz oder ihrer Metaboliten im Bereich bestimmter zerebraler Areale bietet. Nach BRAUNHOFER und ZICHA (1966) wirkt Tegretal bei den innersekretorischen Störungen nicht nur über eine Senkung des gesteigerten Schädelinnendruckes, sondern auch über eine Hemmung der Hormonaktivität des Tumors selbst. MERTENS (1965) nimmt einen peripheren Angriffspunkt an, da er mit Tegretal günstige therapeutische Effekte bei der Behandlung des neuromyotonen Syndroms erzielen konnte.

Einen Angriffspunkt der Substanz im Zuckerstoffwechsel konnten ZICHA und TREMEL (1967) ausschließen.

Auch über Resorption, Verteilung im Körper, Abbau und Ausscheidung von Tegretal ist bisher nichts Sicheres bekannt. Bei Versuchen von BRAUNHOFER und JESCH (1964) trat Tegretal bereits 1-2 Stunden nach der Aufnahme im Harn auf; nach 6 Stunden war eine Dosis von 2oo mg völlig im Urin ausgeschieden. Daraus schlossen die Autoren auf eine prompte Resorption und rasche Ausscheidung durch die Nieren. FÜHR (1964) fand jedoch bei einer Dosierung von 12oo bis 16oo mg nur einen niedrigen Gehalt im Blut und eine Ausscheidung von nur 1-22 mg unveränderter Substanz mit dem Harn. WEIST und ZICHA (1967) stellten noch 3-4 Tage nach Absetzen der Therapie eine Ausscheidung im Urin bei einem Maximum der Harnelimination nach 7 Stunden fest, was sie auf eine Speicherung der Substanz im Organismus zurückführten. Die maximale Tegretalkonzentration betrug noch nicht einmal ein Gamma pro ml. Im Harn fanden sie 7 Metaboliten, von denen sich einer in der Farbe sowie chromatographisch und spektralphotometrisch wie Iminostilben verhielt. Eine Mitwirkung der Leber am Metabolismus und/oder bei der Ausscheidung vermutet KRUEGER (1966). In Tierversuchen von STENGER und ROULET (1964) wurden in der Leber Veränderungen im Sinne einer Volumenzunahme der Leberepithelien im zentralen Läppchenanteil festgestellt, die aber nicht degene-

rativer Natur sein sollen und die REMMER (1963) für nicht spezifisch für Tegretal hält.

Bei der Umwandlung von Tegretal im Stoffwechsel könnten in Anlehnung an den Metabolismus von Tofranil® (SCHINDLER, 196o; HERRMANN und PULVER, 196o; IM OBERSTEG und BÄUMLER, 1961) folgende Substanzen entstehen (siehe Abb. 1):

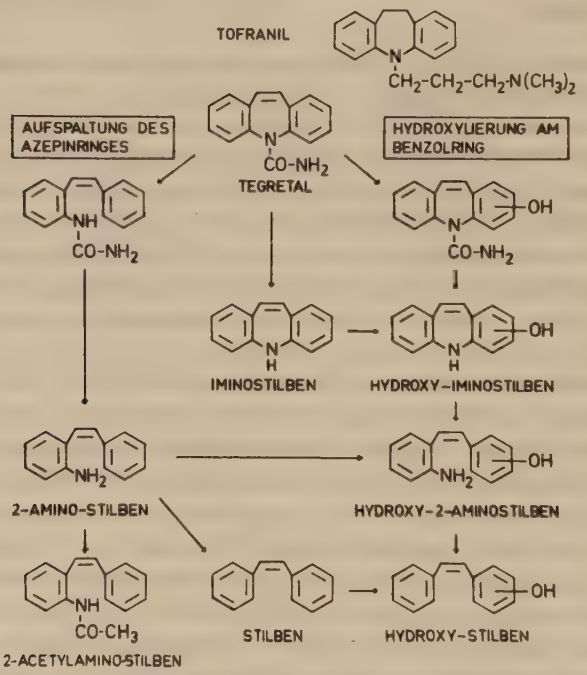

Abb. 1: Schema des hypothetischen Abbaues von Tegretal.

Neben dem gezeigten Formelschema wäre auch noch eine Hydrierung der Doppelbindung im Azepinring denkbar, wobei dann aus Tegretal ähnliche Metaboliten wie aus Tofranil entstehen würden.

II. EIGENE VERSUCHE

A. Chemische und physikalische Eigenschaften von Tegretal

Das vorliegende Tegretal in Reinsubstanz[+)] bestand aus farblosen Kristallen.

1. Löslichkeit

Tegretal ist in Wasser und auch in 3%-iger Harnstofflösung wenig löslich (ca. 12 mg in 1oo ml bei Raumtemperatur).

In 1oo ml	Äther	lösen sich:	1oo mg
" "	Aceton	" " :	1,2 g
" "	Methanol	" " :	2,8 g
" "	Chloroform	" " :	23,5 g

Ermittelt wurden diese Werte, indem bestimmte Mengen gesättigter Lösungen hergestellt, das Lösungsmittel abgedampft und die verbleibende Menge Tegretal gewogen wurde. (bei Raumtemperatur)

In Chloroform löste sich Tegretal demnach am besten.

2. Chromatographisches Verhalten

a) Papierchromatographie

Tegretal wurde im aufsteigenden Verfahren auf SCHLEICHER & SCHÜLL-Papier Nr. 2o43 b MGl chromatographiert. Als Fließmittel wurde das von ALGERI und WALKER beschriebene n-Butanol, gesättigt mit 5 N Ammoniak, verwendet. Die Laufzeit betrug 14 Stunden. Der Rf-Wert lag bei o,8-o,9.

+) Tegretal in Reinsubstanz wurde von der Dr. K. Thomae GmbH Biberach (Riß) zur Verfügung gestellt.

b) Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtplatten wurden mit Hilfe des Streichgerätes der Firma Desaga (Heidelberg) mit Kieselgel HF 254 (Merck) in einer Schichtdicke von etwa o,25 mm belegt. Als Fließmittel wurden Benzol, Chloroform + Äther + Methanol = 7o + 3o + 25, und Chloroform + Aceton = 4 + 1 ausprobiert. Es bewährte sich Chloroform + Aceton = 4 + 1; der Rf-Wert von Tegretal lag bei o,35. Mit Benzol blieb Tegretal auf dem Startfleck, mit Chloroform + Äther + Methanol = 7o + 3o + 25 wanderte es bis zur Front.

3. Nachweisbarkeit

a) Papierchromatographie

aa) Die entwickelten Chromatogramme wurden im Trockenschrank bei 6o°C eine Std. getrocknet und dann unter UV-Licht der Wellenlänge 254 nm betrachtet. Tegretal ließ sich durch seine Absorption bis zu einer unteren Grenze von etwa 5o Gamma nachweisen.

ab) Besprühen der Papiere mit MUNIER's Reagenz ergab ab 5o Gamma eine Orangerotfärbung.

ac) Besprühen mit $FeCl_3$ brachte kein Ergebnis.

b) Dünnschichtchromatographie

ba) Unter UV-Licht bei 254 nm zeigte sich Tegretal als Absorption. Untere Nachweisgrenze: o,5 Gamma.

bb) Durch Besprühen mit MUNIER's Reagens färbte es sich bis hinunter zu 1o Gamma orangerot.

bc) $KMnO_4$ wurde reduziert; es entstanden gelb gefärbte Flecken.

bd) Durch Besprühen mit $Hg_2(NO_3)_2$, $FeCl_3$, HAUCK'schem

und EHRLICH'schem Reagens ließ es sich nicht nachweisen.

be) SCHMIDT, BÖSCHE und KEDING (1966) geben eine nach VIDIC (1959) modifizierte Methode an: die entwickelte Dünnschichtplatte wird für 5 min. in die Chlorkammer gestellt, danach 5 min. an der Luft getrocknet und dann mit o-Dianisidin besprüht. Ab o,5 Gamma färbt sich Tegretal blaugrau, bei höheren Konzentrationen mit braunem Zentrum.

bf) Der empfindlichste Nachweis gelingt nach SCHEIFFARTH, WEIST und ZICHA (1966) durch Besprühen mit 7o-proz. Perchlorsäure und anschließendem Erhitzen auf 12o° für 2o Minuten. Tegretal besitzt eine derart große spezifische Fluoreszenz, daß selbst Mengen von 2 mal $1o^{-8}$g im filtrierten UV-Licht bei 36o nm noch nachweisbar sind. (Zu Beginn meiner Arbeit war dieses Verfahren noch nicht veröffentlicht und konnte deshalb nicht berücksichtigt werden.)

4. Vakuumsublimation

Verwendet wurde die Methode von BEHRENS und FISCHER (1954), modifiziert nach SCHMIDT (1959). Ein dünnes Glasrohr wurde mit einer durchsichtigen, hitzebeständigen Folie ausgekleidet und mit Tegretal in Reinsubstanz beschickt. Ein Ende des Rohres wurde zugeschmolzen, das andere mit der Vakuumpumpe verbunden. Anschließend wurde es in den Sublimationsapparat geschoben. Dieser besteht aus einer mit Heizspiralen umwickelten Glasröhre, in der man mit Hilfe eines Widerstandes einen Temperaturgradienten von etwa 25o-2o° herstellen kann. (korr.) Die Sublimation von Tegretal erfolgte innerhalb 45 Minuten bei 19o° und o,1 Torr. Danach waren im Sublimationsrohr 4 Zonen zu sehen.

Abb. 2

a) Kurz nach dem Rückstand dichte weiße bis gelbliche Drusen, bestehend aus langen dünnen Nadeln mit abgeschrägten Enden und starker Doppelbrechung im polarisierten Licht. (siehe Abb. 2)

b) 5 cm nach dem Rückstand erstarrte Schmelze.

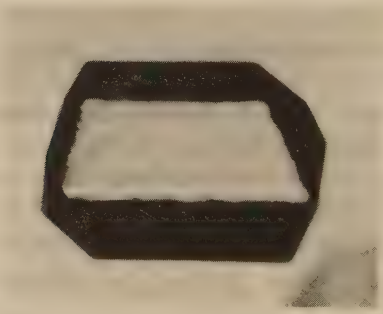

Abb. 3

c) Nach 7 cm einzelne farblose, polygonale, isometrische Kristalle (siehe Abb. 3).

Abb. 4

d) Nach 12-2o cm orange-gelbe,isometrische Kristalle mit rhombischer Grundfläche (siehe Abb. 4).

5. Lichtabsorption im Ultraviolett

Zur Messung der UV-Absorptionsspektren wurde das BECKMAN DK -2 A Spektrophotometer verwendet.

a) Die vorliegende Reinsubstanz von Tegretal hatte in Wasser eine charakteristische UV-Absorptionskurve mit einem Maximum bei 284 nm und einem Minimum bei 255 nm. Die Änderung des p_H-Wertes ergab keine Verschiebung des Absorptionsmaximums und -minimums (siehe Abb. 5).

b) Die unter 4a) genannten Kristalle zeigten in o,5 n Schwefelsäure dasselbe UV-Spektrum.

c) Die UV-Absorptionskurve der unter 4c) genannten Kristalle hatte in o,5 n Schwefelsäure ein Maximum bei 272 nm und ein Minimum bei 243 nm.

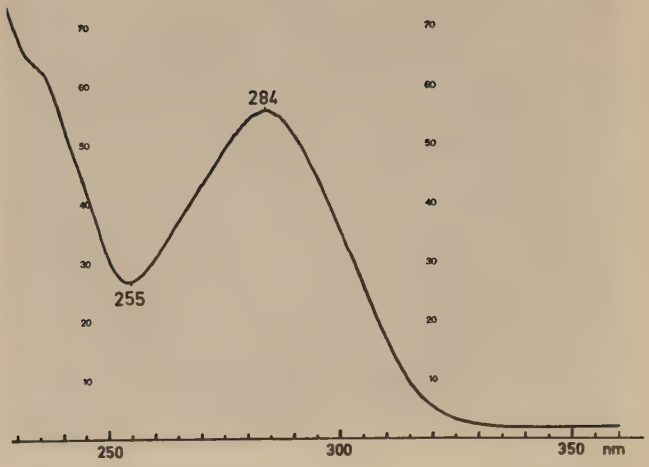

Abb. 5: UV-Absorptionskurve von Tegretal-Reinsubstanz in H_2O.

d) Die UV-Absorptionskurve der unter 4d) genannten Kristalle hatte in o,5 n Schwefelsäure ein Maximum bei 252 nm, ein angedeutetes Maximum bei 283 nm und ein Minimum bei 237 nm.

6. Schmelzpunkt

Der Schmelzpunkt der vorliegenden Reinsubstanz von Tegretal wurde mit 193-194°C angegeben.
Die unter 4a) genannten Kristalle hatten einen Schmelzpunkt von 2o3°,
die unter 4c) genannten einen Schmelzpunkt von 189-19o° und die unter 4d) genannten einen Schmelzpunkt von 193-194°C. (Bestimmung mit dem Kofler-Heiztischmikroskop).

7. IR-Spektrum

Tegretal in Reinsubstanz und die unter 4 a, c und d erwähnten Fraktionen nach Vakuumsublimation von Tegretalreinsubstanz wurden mit der Apparatur der Firma WEBER (Stuttgart) zu KBr-Preßlingen verarbeitet und im BECKMANN IR 5 Spektralphotometer mit Kochsalzoptik gemessen (Abb. 6, 6 a, 6 b, und 6 c).

Die unter 4 a) genannten Kristalle hatten dasselbe IR-Spektrum wie Tegretal in Reinsubstanz (Abb. 6 a), das der unter 4 c) genannten Kristalle wich nicht wesentlich davon ab (Abb. 6 b). Interessant ist, daß das IR-Spektrum der unter 4 d) genannten gelben Kristalle (Abb. 6 c) mit dem von Iminostilben (Abb. 2o) übereinstimmte.

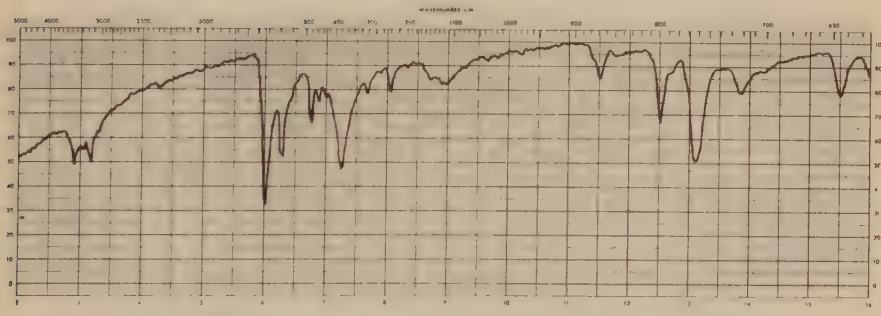

Abb. 6: IR-Spektrum von Tegretal - Reinsubstanz

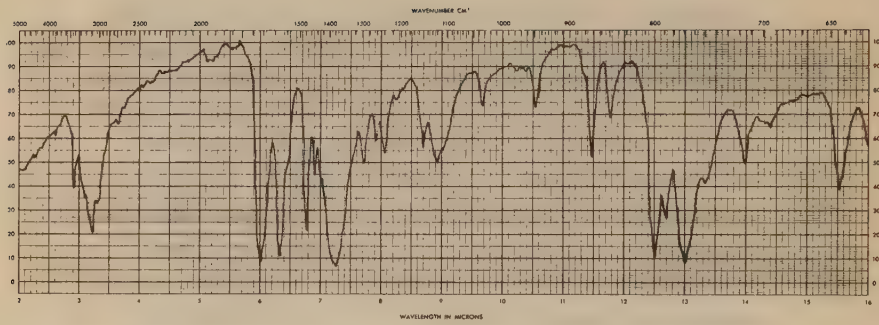

Abb. 6 a: IR-Spektrum von Tegretal nach Vakuumsublimation (weiße bis gelbliche Drusen)

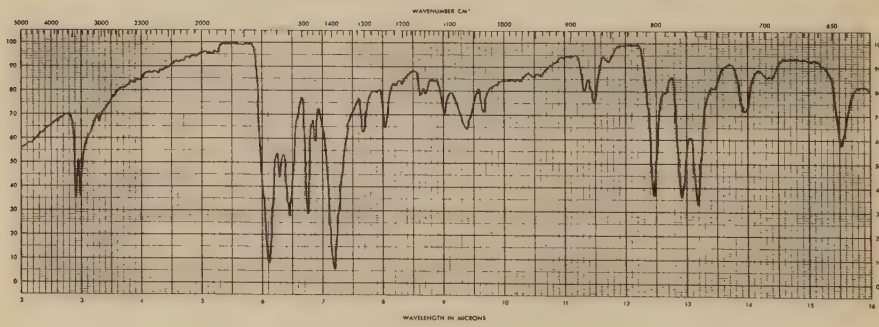

Abb. 6 b: IR-Spektrum von Tegretal nach Vakuumsublimation (farblose, polygonale isometrische Kristalle)

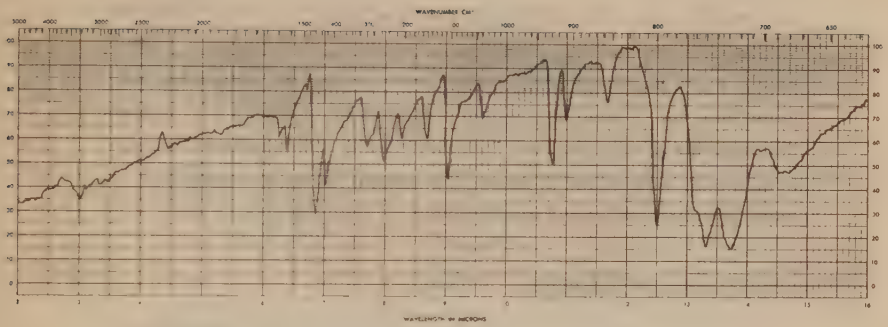

Abb. 6 c: IR-Spektrum von Tegretal nach Vakuumsublimation (orangegelbe isometrische Kristalle)

B. Bestimmung von Eichkurven

Für die Reinsubstanz und für die Reinsubstanz nach Auftragen und Elution wurden Eichkurven aufgestellt. Ebenso wurden für die Reinsubstanz nach Zusatz zu Wasser und nach Zusatz zu Leerharn mit anschließender Extraktion bei verschiedenen p_H-Werten und mit verschiedenen Extraktionsmitteln die Eichkurven bestimmt. Dadurch wurden neben den Verlusten durch Extraktion, Auftragen, Chromatographie und Elution die optimalen Extraktionsbedingungen von Tegretal gefunden und somit die spätere quantitative Auswertung der nach Tegretaleinnahme im Harn unverändert ausgeschiedenen Tegretalmenge ermöglicht.

1. Reinsubstanz

Es wurde eine Stammlösung hergestellt, indem 2oo mg Tegretal in 1oo ml Methanol gelöst wurden, so daß sich in 1 ml Methanol 2 mg bzw. in einer Blutzuckerpipette (o,1 ml) 2oo Gamma Tegretal befanden. Diese Stammlösung wurde auf verschiedene Konzentrationen von 5-25 Gamma/ml Wasser verdünnt und im BECKMAN-Spektrophotometer gemessen.

2. Papierchromatographie

a) Reinsubstanz nach chromatographischer Trennung

Nach dem unter A 2a) angegebenen Verfahren wurde Tegretal in verschiedener Konzentration auf Papierchromatogramme 4 cm vom unteren Rand und mit 2,5 cm Abstand voneinander aufgetragen und chromatographiert. Die unter UV-Licht bei 254 nm markierten Flecke wurden ausgeschnitten und 3o Minuten mit 5 ml o,5 proz. wäßriger Na-tetraborat-Lösung eluiert. Das Eluat wurde in eine Quarzküvette gefüllt und die Extinktion spektrophotometrisch gemessen.

b) Zusatzversuche zu Wasser

Zu 25 ml Wasser wurden bestimmte Mengen Tegretal zugesetzt und mit Weinsäure auf einen p_H-Wert von 3 eingestellt. Extrahiert wurde jeweils 3 min. mit der doppelten Menge an Chloroform. Nach längerem Stehen wurde die Chloroformphase abgelassen und die wäßrige Schicht noch einmal mit Chloroform ausgeschüttelt. Der gesamte Extrakt wurde dann über Natriumsulfat getrocknet und anschließend im Wasserbad abgedampft. Der Rückstand wurde in Aceton gelöst und mit einer beiderseits offenen Kapillare auf Papier aufgetragen. Die Papiere wurden dann

chromatographiert, eluiert und die Extinktion gemessen.
Es wurden weitere Eichkurven für Extraktionen bei p_H 7 (mit Natriumhydrogencarbonat) und p_H 12 (mit Natriumcarbonat) aufgestellt.

Wie aus Abb. 7 hervorgeht, betrug der Verlust durch Chromatographie und Elution 8,5%, der durch Extraktion im alkalischen Milieu auf 22,5% erhöht wurde.
Der Verlust war im Neutralen mit 32,5% und im Sauren mit 42,5% sehr viel höher.
Mit Äther konnten jeweils noch 3-4% weniger Tegretal als mit Chloroform extrahiert werden.

c) Zusatzversuche zu Leerharn

In der beschriebenen Weise wurden dieselben Mengen Tegretal zu Leerharn zugesetzt und ausgeschüttelt. Bei der photometrischen Messung wurde stets gegen Leerharn-Extrakte gemessen, um eine von natürlichen Harnbegleitstoffen hervorgerufene Absorption auszugleichen.

Abb. 7 zeigt, daß die Ausbeute im Alkalischen mit 81,5% größer war als bei Extraktion aus Wasser, was durch eine geringfügig bessere Löslichkeit von Tegretal in Harnstofflösung erklärt werden kann.

Der Verlust bei Extraktion im Neutralen betrug 24%, bei Ausschüttelung im Sauren 45,5%.

Die Extraktion mit Äther brachte wieder größere Verluste als die mit Chloroform (etwa 10%).

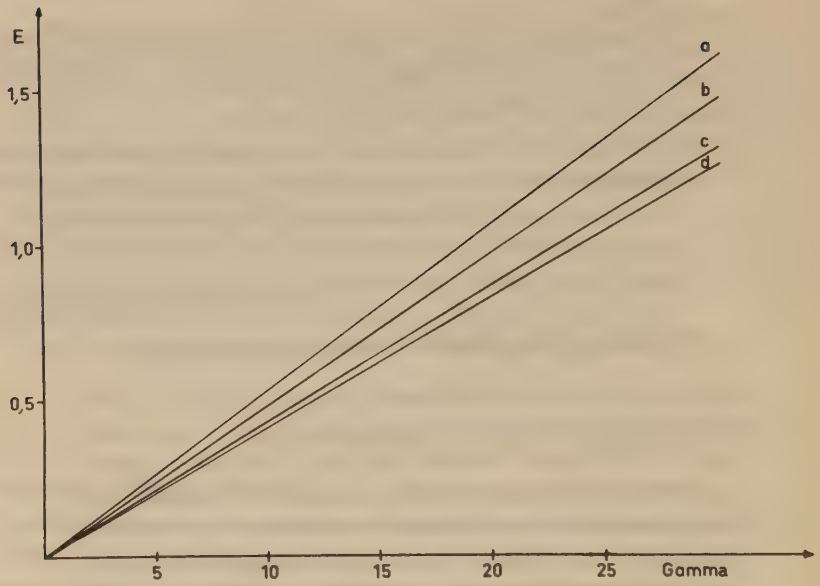

Abb. 7: Eichkurven von Tegretal

a) Reinsubstanz

b) Reinsubstanz nach Papierchromatographie und Elution mit Boratpuffer

c) Zusatz zu Leerharn, Extraktion bei p_H 12 mit Chloroform, Papierchromatographie und Elution mit Boratpuffer

d) Zusatz zu Wasser, Extraktion bei p_H 12 mit Chloroform, Papierchromatographie und Elution mit Boratpuffer

3. Dünnschichtchromatographie

In den folgenden Selbstversuchen erwies sich die papierchromatographische Auftrennung als ungenügend. Bei nied-

rigen Konzentrationen verlief die UV-Absorptionskurve uncharakteristisch und konnte nicht ausgewertet werden. Deshalb wurde zu der empfindlicheren Dünnschichtchromatographie (STAHL, 1962) übergegangen.
Für die quantitative Auswertung der Selbstversuche mußten wieder Eichkurven aufgestellt werden.

a) Reinsubstanz nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung

Tegretal wurde in bestimmter Konzentration bandförmig auf Dünnschichtplatten aufgetragen, die wie auf S. 8 beschrieben, hergestellt wurden. Nach der Auftrennung mit dem Laufmittel Chloroform + Aceton = 4 + 1 wurde die im gefilterten UV-Licht sichtbare Tegretalzone abgekratzt und 3o Minuten lang mit 3 ml Elutionsmittel eluiert, wofür neben o,5 proz. Boratpuffer o,5 n Schwefelsäure ausprobiert wurde. Das Eluat wurde 5 Minuten bei 5ooo Umdrehungen/min. zentrifugiert, vorsichtig in die Quarzküvetten gefüllt und die Extinktion spektrophotometrisch gemessen.

b) Zusatzversuche zu Leerharn

In der nun schon bekannten Weise wurde Tegretal zu Leerharn zugesetzt und bei sodaalkalischem Milieu ausgeschüttelt. Auftragen und Auswerten erfolgte wie bei II B 3a).

Der Verlust durch die Extraktion betrug 15%; der Verlust wurde durch die Elution mit o,5 proz. Boratpuffer auf 24%, durch Elution mit o,5 n H_2SO_4 sogar auf 29% gesteigert.

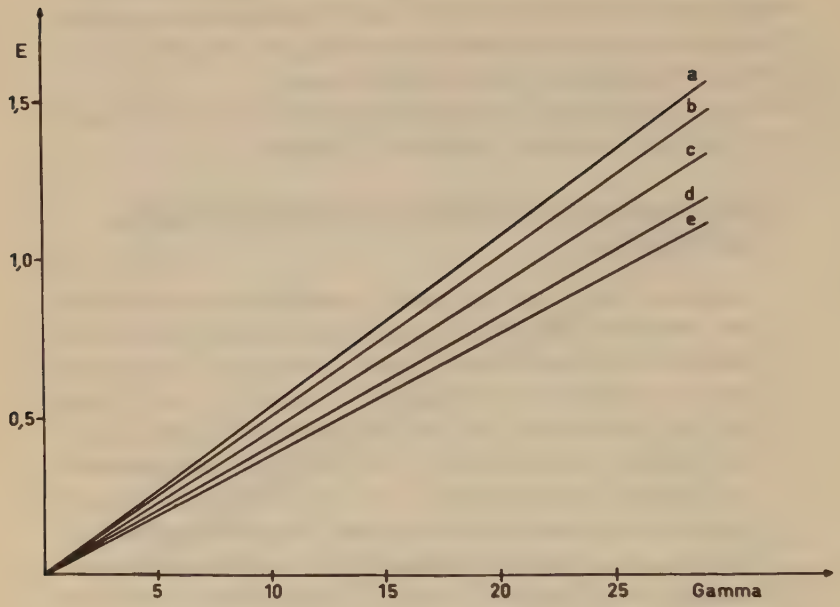

Abb. 8: Eichkurven von Tegretal

a) Reinsubstanz

b) Reinsubstanz nach Dünnschichtchromatographie und Elution mit Boratpuffer

c) Reinsubstanz nach Dünnschichtchromatographie und Elution mit o,5 n Schwefelsäure

d) Zusatz zu Leerharn, Extraktion bei p_H12 mit Chloroform, Dünnschichtchromatographie und Elution mit Boratpuffer

e) Zusatz zu Leerharn, Extraktion bei p_H12 mit Chloroform, Dünnschichtchromatographie und Elution mit o,5 n Schwefelsäure.

C. Hauptversuche mit Harn nach Tegretaleinnahme

In der Literatur sind nur wenige Extraktionsmethoden für Tegretal beschrieben:

a) Nach der von der Geigy AG zur Verfügung gestellten Analysenanweisung wird 5 ml Plasma oder Serum mit 1o ml gereinigtem Äthylenchlorid ausgeschüttelt. Das abgetrennte Äthylenchlorid wird filtriert und auf dem Wasserbad zur Trockne eingedampft. Dazu gibt man 2 ml Natriumnitrit 3% und 3 ml der verdünnten Salpetersäure (1 Vol. konz. HNO_3 zu 2 Vol. aq. dest.).

Man läßt 9o Minuten bei 25° verschlossen stehen und schüttelt wieder mit Äthylenchlorid aus. Nach kurzem Zentrifugieren wird die wäßrige Phase verworfen und das Äthylenchlorid über Natriumsulfat getrocknet.

Die Extinktion der klaren Lösung wird bei 4oo nm gegen einen Leerwert gemessen.

b) FÜHR (1964) modifizierte diese Methode: zur Extraktion werden 3 ml Harn oder Blut mit 9 ml n-HCl und 15 ml Äthylenchlorid ausgeschüttelt. Die Äthylenchlorid-Phase wird mit 15 ml n NaOH gereinigt und über Natriumsulfat getrocknet. Die Absorption des Extraktes bei 29o nm wird in einem Spektralphotometer in Quarzküvetten bei einer Spaltbreite von o,o6 nm gemessen.

c) SCHEIFFARTH, WEIST und ZICHA (1966) schütteln 3 mal mit 1,2-Dichloräthan aus. Der Extrakt wird bei 4o° unter schwachem Unterdruck zur Trockne eingeengt, erneut in 1,2-Dichloräthan aufgenommen, auf Dünnschichtplatten aufgetragen und mit dem Steigmittel Tetrachlorkohlen-

stoff : Methanol 75:25 entwickelt. Tegretal und seine Metaboliten werden mit 7o-proz. Perchlorsäure aus dem abgekratzten Kieselgel eluiert, für 2o Minuten auf 12o° erhitzt und anschließend mit dem ZEISSschen Fluoreszenzspektrophotometer bestimmt. Das Anregungsmaximum liegt bei 358 nm, das Emissionsmaximum bei 498 nm, die Spaltbreite beträgt für den Eingangsspalt o,5, für den Emissionsspalt o,4 cm, die Verstärkung 2/1/7/4.

Wir gingen bei zwei Selbstversuchen im einzelnen folgendermaßen vor:

1. Selbstversuch

Die Versuchsperson - 25-jährig, 73 kg schwer - nahm nach zweitägiger xanthinfreier Kost 2 Tabletten Tegretal = 4oo mg p.o. ein. Andere Arzneimittel wurden vor und während dem Versuch nicht eingenommen.
Außer einer leichten, kurzdauernden Benommenheit fielen keine Nebenerscheinungen auf.
Spontane Harnportionen wurden nach 3, 6, 9, 12, 21, 24, 29, 34, 37, 46 und 69 Stunden gesammelt.
Von den einzelnen Portionen wurden jeweils 1o ml mit Na_2CO_3 auf p_H12 gebracht und mit der doppelten Menge an Chloroform 2mal extrahiert. Das Lösungsmittel wurde im Wasserbad abgedampft, der Rückstand in Aceton gelöst, quantitativ auf Dünnschichtplatten aufgetragen und mit dem Laufmittel Chloroform + Aceton = 4+1 aufgetrennt.

a) Nachweis von Tegretal und seinen Metaboliten

Auf den Dünnschichtplatten waren im gefilterten UV-Licht vier Zonen zu unterscheiden:
eine Absorption bei Rf o,35, die auf derselben Höhe wie das mitaufgetragene Tegretal saß; eine schwache dunkelblaue Fluoreszenz bei Rf o,7o;

eine blaßblaue Fluoreszenz bei Rf o,85 und eine im Sichtbaren gelbbraune Absorption bei Rf o,9o (siehe Abb. 9).

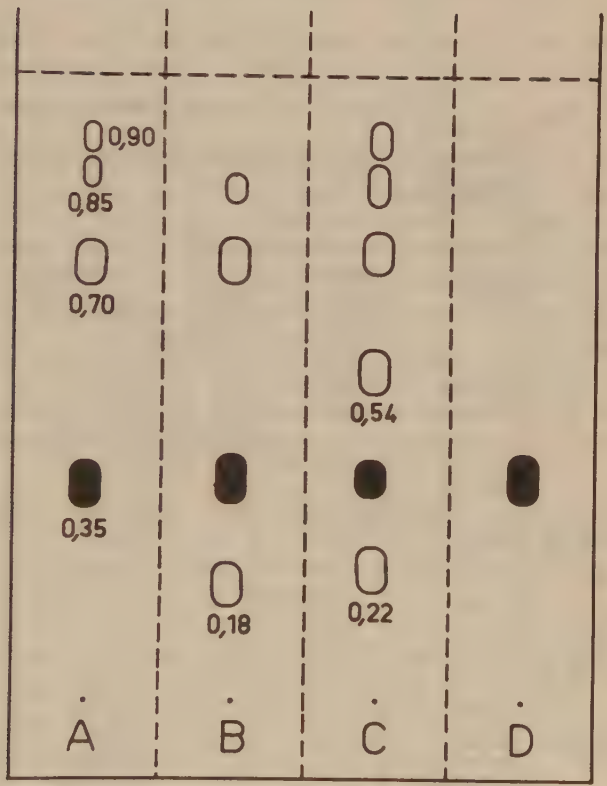

Abb.9: Dünnschichtchromatogramm von Harn nach Einnahme von Tegretal.

A: 1o ml Versuchsharn nach Einnahme von 4oo mg Tegretal (1. Selbstversuch, 24 hpa)

B: 1o ml Versuchsharn nach Einnahme von 4oo mg Tegretal (2. Selbstversuch, 23 hpa)

C: 1o ml Versuchsharn bei Dauermedikation von Tegretal (Versuchsperson 7, 12oo mg täglich)

D: 1o Gamma Tegretal-Reinsubstanz

Diese Substanzflecken waren im Leerharn nicht nachzuweisen, es handelte sich also um Tegretal und Tegretalmetaboliten. Ab jetzt werden diese Substanzen als Metabolit I (Rf-Wert o,7o), Metabolit II (Rf-Wert o,85) und Metabolit III (Rf-Wert o,9o) bezeichnet.

	aus Harn extrahiertes Tegretal	Metabolit				
		I	II	III	IV	V
Rf-Wert	o,35	o,7o	o,85	o,9o	o,18	o,53
Verhalten im gefilterten UV-Licht	Absorption	schwach dunkelblaue Fluoresz.	blaßblaue Fluoreszenz	im Sichtbar.gelbe Absorpt.	blaßblaue Fluoreszenz	blaßblaue Fluoreszenz
$\lambda_{max.}$	285 nm 258 nm	254,5 nm	353 nm 336 nm 256 nm	357 nm 342 nm 257 nm	353 nm 336 nm 255 nm	257 nm
$\lambda_{min.}$	262 nm 252 nm	236 nm	242 nm	234 nm	238 nm	238 nm
Munier's R.	rot	--	--	rot	--	--
Hauck R.	--	--	--	--	--	--
$FeCl_3$	--	--	--	--	--	--
$Hg(NO_3)_2$	--	--	--	--	--	--
Ehrlich's R.	--	--	--	--	--	--
$KMnO_4$	red.	--	--	red.	--	--
Chlor/o-Dianisidin	blaugrau bis orangebraun	--	--	blaugrau bis orangebraun	--	--

Tabelle 1: Verhalten von Tegretal und seinen Metaboliten nach Dünnschichtchromatographie gegenüber verschiedenen Reagentien (Harnextrakte).

Zur besseren Übersicht sind noch die Rf-Werte, das Aussehen im gefilterten UV-Licht und die Absorptionsmaxima und -minima eingetragen.

Tab. 1 faßt die Ergebnisse der Versuche mit Sprühreagentien zum Nachweis der Metaboliten von Tegretal auf Dünnschichtplatten zusammen. Darin enthalten sind auch schon zwei Metaboliten, die erst bei den späteren Versuchen gefunden wurden.

Die Metaboliten I, II und IV waren gut im UV-Licht bei 254 nm zu sehen, dagegen nicht nachweisbar mit den benützten Sprühreagentien.

Metabolit III färbte sich mit MUNIER's Reagens rot, mit Chlor/o-Dianisidin blau bis blaurot und reduzierte $KMnO_4$.

Die Substanz in Höhe von Tegretal wurde mit 3 ml o,5 proz. Boratpuffer 3o Minuten eluiert, dann zentrifugiert und die Extinktion gemessen. Die Absorptionsmaxima und -minima sind aus Tab. 1 ersichtlich. Sie stimmen ungefähr mit denen von Tegretal überein. Das Maximum bei 258 nm dürfte von einem Metaboliten stammen, der in derselben Höhe sitzt wie Tegretal.

Die Substanzflecken I,II und III wurden mit 3 ml o,5 n Schwefelsäure eluiert, um die als Salze zu erwartenden Metaboliten in schwefelsaure Basen zu überführen und sie somit besser lösen zu können.

Die photometrische Messung ergab UV-Absorptionsmaxima und -minima, die aus den Abb. 1o, 11 und 12 und Tab. 1 zu entnehmen sind.

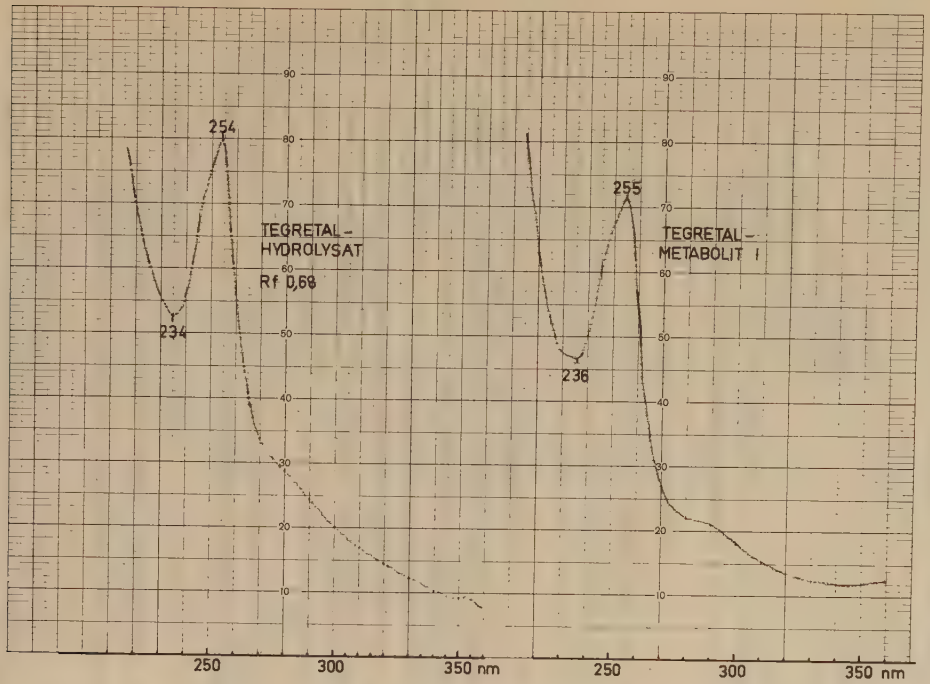

Abb. 1o: UV-Absorptionskurven des Tegretalmetaboliten I (Rf o,7o) im Harn nach Einnahme von 4oo mg Tegretal (Elution mit o,5 n Schwefelsäure) und der Substanz bei Rf o,68 nach Tegretalhydrolyse (Elution mit o,5 n Schwefelsäure).

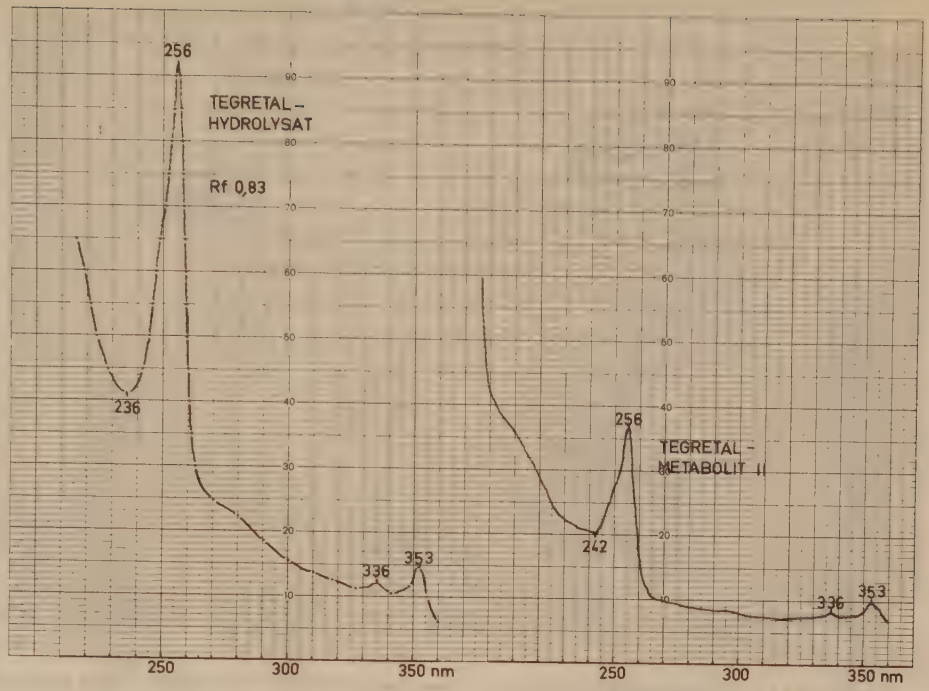

Abb. 11: UV-Absorptionskurven des Tegretalmetaboliten II (Rf o,8o) im Harn nach Einnahme von 4oo mg Tegretal (Elution mit o,5 n Schwefelsäure) und der Substanz bei Rf o,83 nach Tegretalhydrolyse (Elution mit o,5 n Schwefelsäure).

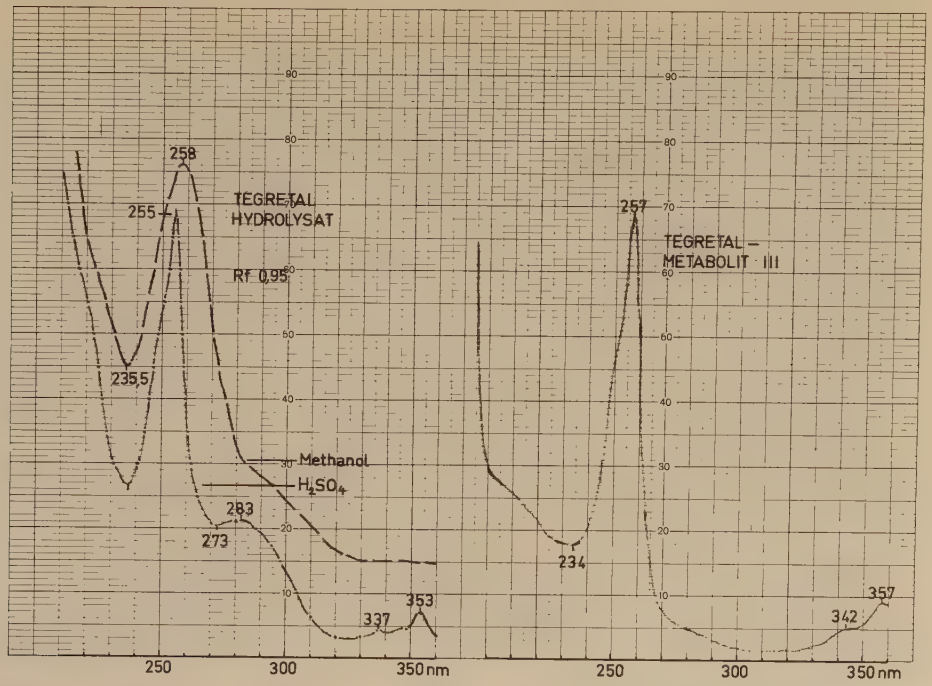

Abb. 12: UV-Absorptionskurven des Tegretalmetaboliten III (Elution mit o,5 n Schwefelsäure) und der Substanz bei Rf-Wert o,95 nach Tegretalhydrolyse (Elution mit Methanol und o,5 n Schwefelsäure).

b) Quantitative Bestimmung der Tegretalausscheidung

Die gemessenen Extinktionen von jeweils 1o ml der einzelnen Harnportionen wurden ausgewertet, indem an Hand der Eichkurven die entsprechende Konzentration/ml Harn bestimmt wurde. Daraus konnte die Gesamtkonzentration und -menge der Einzelportionen leicht errechnet werden.

hpa	Harnmenge in ml	Konzentration in Gamma %	Ausgeschiedene Menge in Gamma	Prozent der ausgeschiedenen Menge
0-3	242	46	112,o	14,4
3-6	78	6o	46,o	5,9
6-9	83	73	6o,o	7,6
9-12	1o8	8o	86,o	11,o
12-21	257	34	87,5	11,2
21-24	218	34	74,o	9,4
24-29	178	38	67,5	8,6
29-34	1oo	3o	3o,o	3,8
34-37	153	24	36,6	4,7
37-46	668	19	127,o	16,2
46-69	453	12,5	56,5	7,2 +)
Summe			783,1	1oo,o

Tabelle 2: 1. Selbstversuch; Tegretalausscheidung im Harn nach Einnahme von 4oo mg Tegretal.

Unverändertes Tegretal war von Beginn bis Ende des Versuches nachzuweisen. 69 Stunden nach Einnahme waren im Harn insgesamt o,8 mg ausgeschieden, was o,2% der eingenommenen Menge entspricht. Innerhalb der ersten drei Stunden wurden 112 Gamma ausgeschieden; das

+) Zwischen der 46. und 69. Stunde nach Einnahme wurde nicht sämtlicher Harn aufbewahrt.

sind 14,4% der unverändert ausgeschiedenen Menge. 37-46 Stunden nach Aufnahme wurden noch einmal 127 Gamma = 16,2% der unveränderten Gesamtmenge ausgeschieden.
Die größte Tegretalkonzentration wurde zwischen der 9. und 12. Stunde nach Versuchsbeginn mit 8o Gammaprozent erreicht.

c) Ausscheidung der Metaboliten I, II und III.

Metabolit I konnte von Beginn bis Ende des Versuchs nachgewiesen werden. Metabolit II trat auch schon in den ersten drei Stunden nach Aufnahme auf, war aber ab der 37. Stunde nicht mehr nachweisbar.
Metabolit III zeigte sich nur zwischen der 21. und 29. Stunde nach Einnahme.

Da die Metaboliten von Tegretal bis heute noch nicht bekannt sind, konnten keine Eichkurven zu ihrer quantitativen Bestimmung angefertigt werden. Trotzdem wurden ihre Extinktionen in 1o ml Harn gemessen; damit konnte eine Aussage über die Gesamtextinktion der einzelnen Harnportionen und somit über den Ausscheidungs- und Konzentrationsgipfel der Metaboliten gemacht werden. Um wenigstens eine grob quantitative Angabe über die Ausscheidung der Tegretalmetaboliten machen zu können, wurden ihre Extinktionen in den einzelnen Harnportionen mit Hilfe der Eichkurve für Tegretal in Gamma umgerechnet (Tabelle 3).

Insgesamt wurden von dem Metaboliten I ungefähr 382 Gamma, von dem Metaboliten II 134o Gamma und von dem Metaboliten III 54o Gamma im Harn ausgeschieden. Somit betrug die Gesamtmenge etwa 2,27 mg, d.h., von den aufgenommenen 4oo mg Tegretal wurden etwa o,55% als Abbauprodukte mit dem Harn ausgeschieden.

Der Ausscheidungsgipfel des Metaboliten I lag zwischen der 12. und 21. Stunde nach Einnahme, der des Metabo-

hpa	Harnmenge in ml	Extinktion in 1o ml Harn			Extinktion der gesamten Harnportion			Ungefähre Ausscheidung in Gamma		
		Metabolit			Metabolit			Metabolit		
		I	II	III	I	II	III	I	II	III
o-3	242	o,o6	o,3o	--	1;45	7,26	--	37,9	189,o	--
3-6	78	o,o45	o,25	--	o,35	1,95	--	9,1	51,o	--
6-9	83	o,o9	o,39	--	o,75	3,24	--	19,6	84,5	--
9-12	1o8	o,o6	o,54	--	o,64	5,83	--	16,7	152,o	--
12-21	257	o,3o	o,3o	--	7,71	7,71	--	2o2,o	2o2,o	--
21-24	218	o,o6	o,15	o,36	1,3o	3,27	7,85	34,o	85,5	2o5,o
24-29	178	o,o75	1,14	o,72	1,34	2o,29	12,82	35,o	529,5	335,o
29-34	1oo	o,o6	o,135	--	o,6o	1,35	--	15,6	35,3	--
34-37	153	o,o3	o,o3	--	o,46	o,46	--	12,o	12,o	--
37-46	668	nicht auswertbar	--	--	nicht auswertbar	--	--	nicht auswertbar	--	--
46-69	453	"	--	--	"	--	--	"	--	--
Summe								381,9	134o,8	54o,o

Tabelle 3: 1. Selbstversuch; Extinktionen der Metaboliten I, II und III nach Aufnahme von 4oo mg Tegretal. Auswertung mit Hilfe der Eichkurve von Tegretal.

liten II und des Metaboliten III zwischen der 24. und 29. Stunde.

Die größte Konzentration von Metabolit I war in der Zeit zwischen der 12. und 21. Stunde nach Versuchsbeginn, die der Metaboliten II und III zwischen der 24. und 29. Stunde.

2. 2. Selbstversuch

Zur Überprüfung der Ergebnisse des ersten Selbstversuches wurden in einem zweiten Selbstversuch wieder 4oo mg Tegretal p.o. eingenommen. (6 Wochen später) Spontane Harnportionen wurden nach 3, 5, 9, 16, 23, 3o, 31, 39, 47, 51 und 65 Stunden gewonnen. Die Aufarbeitung erfolgte wie beim ersten Selbstversuch.
Auf den Dünnschichtchromatogrammen sah man wieder 4 Zonen beim Betrachten im gefilterten UV-Licht (siehe Abb.9B): eine Absorption bei Rf o,35 in Höhe der mitaufgetragenen Tegretalreinsubstanz; eine blaue Fluoreszenz bei Rf o,7o; eine blaßblaue Fluoreszenz bei Rf o,82; und eine blaßblaue Fluoreszenz bei Rf o,18.
Der beim ersten Selbstversuch aufgetretene, im Sichtbaren gelbe Substanzfleck war nicht zu sehen.
Im folgenden wird die der blaßblauen Fluoreszenz bei Rf o,18 entsprechende Substanz "Metabolit IV" genannt. Dieser wurde mit 3 ml o,5 n H_2SO_4 3o min. eluiert, dann zentrifugiert und seine UV-Absorptionskurve gemessen. (siehe Abb. 13 und Tab. 1)

Die Absorption bei Rf o,35 entsprach nach Rf und Absorptionskurve Tegretal, die dunkelblaue Fluoreszenz bei Rf o,7o und die blaßblaue Fluoreszenz bei Rf o,82 den Substanzen I und II des ersten Selbstversuches.

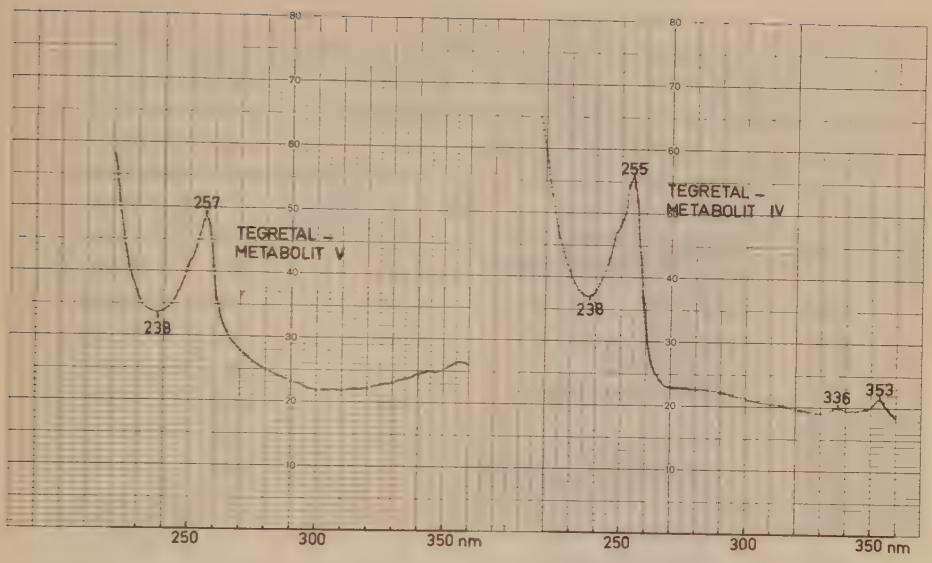

Abb. 13: UV-Absorptionskurven der Tegretal-metaboliten IV und V aus Harn nach Einnahme von 400 mg Tegretal. Elution mit 0,5 n Schwefelsäure.

a) Quantitative Bestimmung der Tegretalausscheidung

Unverändertes Tegretal wurde wieder während der gesamten Versuchsdauer gefunden. Die Ausscheidung in 65 Stunden nach Einnahme von 400 mg Tegretal betrug 1,42 mg, was 0,35% der eingenommenen Menge entspricht. Innerhalb der ersten 16 Stunden waren über 50% der unverändert ausgeschiedenen Menge ausgeschieden. Der Ausscheidungsgipfel wurde zwischen der 5. und 9. Stunde erreicht. Die Tegretalkonzentration war zwischen der 23. und 30. Stunde am größten mit 87 Gammaprozent.

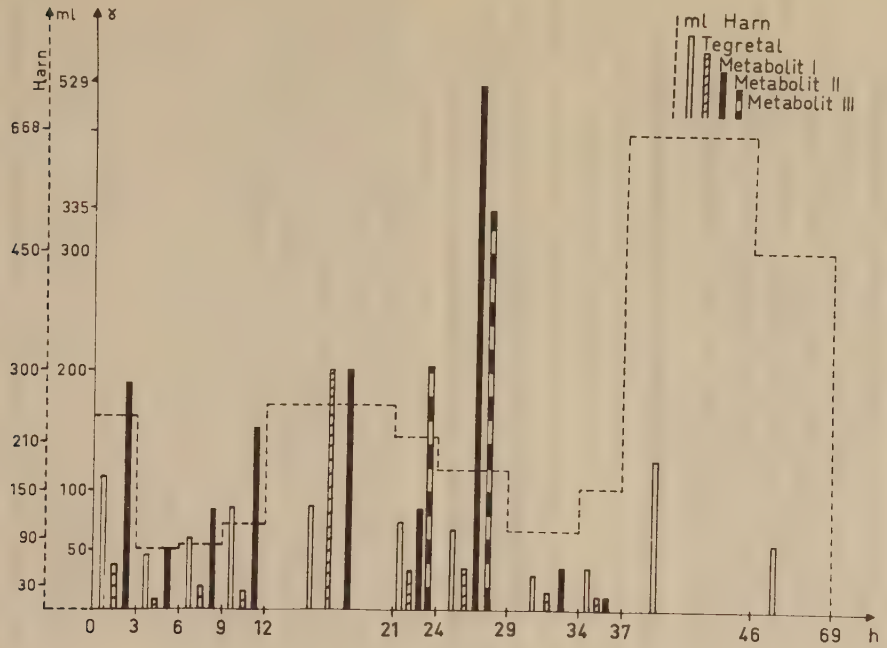

Abb. 14: 1. Selbstversuch; Ausscheidung von Tegretal und seinen Metaboliten im Harn nach Einnahme von 400 mg Tegretal.

hpa	Harnmenge in ml	Konzentration in Gamma %	Ausgeschiedene Menge in Gamma	Prozent der ausgeschiedenen Menge
o-3	24o	44	1o5,o	7,4
3-5	85	5o	42,5	3,o
5-9	665	67	442,o	31,3
9-16	26o	68	174,o	12,3
16-23	235	87	2o5,o	14,4
23-3o	245	56	138,o	9,7
3o-31	85	42	35,7	2,5
31-39	16o	39	62,4	4,4
39-47	22o	28	61,5	4,3
47-51	26o	39	1o1,o	7,1
51-65	16o	32	51,o	3,6
Summe			1418,1	1oo,o

Tabelle 4: 2. Selbstversuch; Tegretalausscheidung im Harn nach Einnahme von 4oo mg Tegretal.

b) Ausscheidung der Metaboliten I, II und IV

Metabolit I war ab der 3. Stunde nach Einnahme bis zum Versuchsende im Urin nachweisbar. Metabolit II trat erst ab der 9. Stunde auf, war aber im Gegensatz zum ersten Selbstversuch bis Versuchsende als Fluoreszenz im gefilterten UV-Licht auf den Dünnschichtplatten zu sehen.

Die Auswertung der Extinktionen der UV-Absorptionskurven dieser Metaboliten wurde wieder an Hand der Eichkurve für Tegretal vorgenommen (Tab. 5).

Im Verlauf des Versuchs wurden mit dem Harn etwa 358 Gamma des Metaboliten I, 39 Gamma des Metaboliten II und 2772 Gamma des Metaboliten IV ausgeschieden, zusammen etwa 3,17 mg. Während der Dauer dieses Selbstver-

hpa	Harnmenge in ml	Extinktion in 1o ml Harn			Extinktion der gesamten Harnportion			Ungefähre Ausscheidung in Gamma		
		Metabolit			Metabolit			Metabolit		
		I	II	IV	I	II	IV	I	II	IV
o-3	24o	--	--	--	--	--	--	--	--	--
3-5	85	nicht auswertbar	--	--	nicht auswertbar	--	--	nicht auswertbar	-	--
5-9	665	"	--	--	"	--	--	"	--	--
9-16	26o	o,12	o,o3	o,42	3,12	o,78	1o,92	81,5	2o,3	285,o
16-23	235	o,12	o,o3	o,6o	2,82	o,7o	14,1o	73,8	18,3	369,o
23-3o	245	o,o9	nicht auswertbar	o,84	2,2o	nicht auswertbar	2o,58	57,5	nicht auswertbar	539,o
3o-31	85	o,o9	"	o,93	o,76	"	7,9o	19,8	"	2o7,o
31-39	16o	o,o3	"	o,72	o,48	"	11,52	12,5	"	3oo,o
39-47	22o	o,o6	"	o,72	1,32	"	15,84	34,5	"	415,o
47-51	26o	o,o6	"	o,6o	1,56	"	15,6o	4o,8	"	4o7,o
51-65	16o	o,o9	"	o,6o	1,44	"	9,6o	37,7	"	25o,o
Summe								358,1	38,6	2772,o

Tabelle 5: 2.Selbstversuch; Extinktion der Metaboliten I, II und IV nach Aufnahme von 4oo mg Tegretal. Auswertung mit Hilfe der Eichkurve von Tegretal.

suches wurden also ungefähr o,79% der eingenommenen 4oo mg Tegretal in Form von Stoffwechselprodukten mit dem Urin eliminiert.
Der Ausscheidungsgipfel der Metaboliten I und II lag zwischen der 9. und 16. Stunde nach Versuchsbeginn und der des Metaboliten IV zwischen der 23. und 3o. Stunde. Die Konzentrationen der Metaboliten I und II waren zwischen der 9. und 16. Stunde, die von Metabolit IV zwischen der 3o. und 31. Stunde am größten.

3. Patienten unter Tegretaldauermedikation

Um die Verhältnisse der Tegretalausscheidung bei Tegretaldauermedikation zu überprüfen, wurden Harnportionen von 15 Patienten untersucht, die unter Tegretaldauermedikation standen und möglichst keine anderen Arzneimittel erhielten.+)

Die Aufarbeitung von jeweils 1o ml Harn erfolgte wie beim ersten Selbstversuch.
Auf den entwickelten Dünnschichtplatten waren im UV-Licht bei 254 nm 6 Zonen zu sehen (siehe Abb. 9C): Eine Absorption bei Rf o,35 in Höhe der mitaufgetragenen Tegretalreinsubstanz; eine schwache dunkelblaue Fluoreszenz bei Rf o,72 (bei allen VP); blaßblaue Fluoreszenzen bei Rf o,21 (nur bei VP 7,8,14 und 15), bei Rf o,53 (nicht bei VP 9-12) und bei Rf o,84 und eine im Sichtbaren gelbbraune Absorption bei Rf o,9o (nicht bei VP 9-12).
Die der blaßblauen Fluoreszenz bei Rf o,53 entsprechende Substanz wird im folgenden als "Metabolit V" bezeichnet. Er wurde mit 3 ml o,5 n H_2SO_4 3o min. eluiert und seine UV-Absorptionskurve gemessen (siehe Abb. 13).

+) Ich danke den Psychiatrischen Landeskrankenhäusern Schussenried und Weißenau für die freundliche Überlassung der Harnproben.

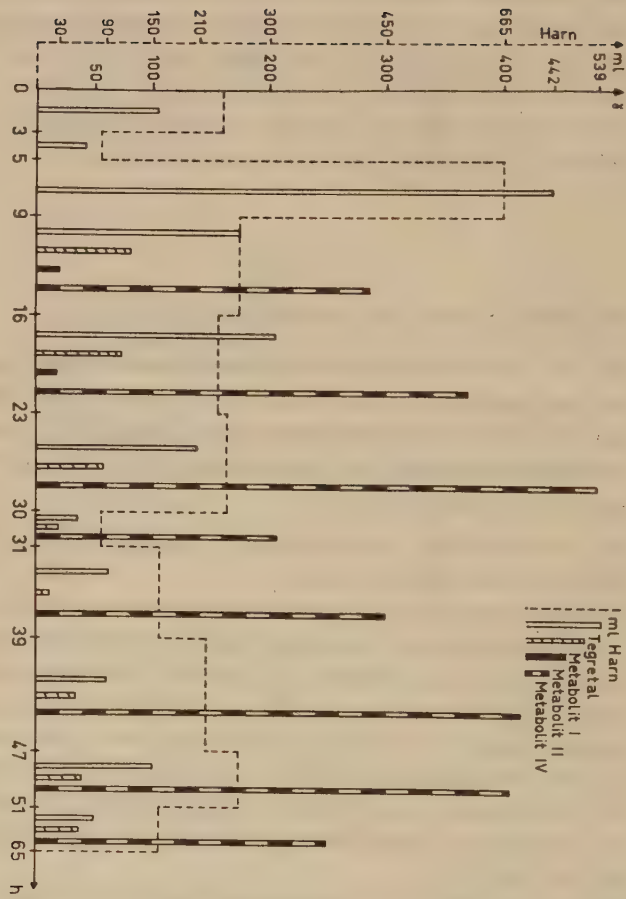

Abb. 15: 2. Selbstversuch; Ausscheidung von Tegretal und seinen Metaboliten nach Einnahme von 400 mg Tegretal.

Die übrigen Zonen entsprachen nach Rf-Wert und UV-Absorptionskurven Tegretal und den schon erwähnten Metaboliten I, II, III und IV.

a) Ausscheidung von Tegretal

An Hand der Eichkurve wurde die Tegretalkonzentration der Harnportionen der 15 Versuchspersonen bestimmt. Bei der Annahme einer täglichen mittleren Harnausscheidung von 1500 ml errechnete sich die geringste unverändert ausgeschiedene Tegretalmenge pro Tag mit 0,40 mg, die höchste mit 3,24 mg. Da in beiden Fällen 1200 mg Tegretal täglich eingenommen wurden, entsprach dies einer täglichen Ausscheidung von 0,03 bzw. 0,27% der täglichen Aufnahme (siehe Tab. 6).
Die Ergebnisse unterscheiden sich also nicht von denen der beiden Selbstversuche.

b) Ausscheidung der Tegretalmetaboliten I-V

Es wurden wieder die Extinktionen der Tegretalmetaboliten in 10 ml Harn gemessen und auf die angenommene tägliche Harnmenge von 1500 ml umgerechnet. Für eine orientierende quantitative Auswertung wurde wie in den beiden Selbstversuchen die Eichkurve für Tegretal benützt (Tabelle 7).

Die geschätzte tägliche Gesamtausscheidung der Metaboliten I-V aller Versuchspersonen lag zwischen 1,41 und 47,45 mg bei verschiedener Dosierung, was 0,23 und 3,95% der täglichen Tegretaleinnahme entsprach.

Eine Abhängigkeit der Ausscheidung der Metaboliten mit dem Harn von der Tegretaldosierung konnte nicht festgestellt werden.

Versuchsperson	Geschlecht	Alter in Jahren	Gewicht in kg	Tagesmedikation in mg	Konzentration in Gamma %	Tagesausscheidung in mg	Ausscheidung in % der tägl. Einnahme
1	männl.	45	85	6oo	27,o	o,4o	o,o67
2	männl.	44	68,5	6oo	38,o	o,57	o,o95
3	männl.	21	1o2	6oo	53,3	o,8o	o,134
4	männl.	54	72	6oo	12o,o	1,8o	o,3o
5	männl.	45	71	12oo	216,o	3,24	o,27
6	weibl.	53	6o	1ooo	86,6	1,3o	o,13
7	männl.	35	68	12oo	63,3	o,95	o,o8
8	männl.	25	6o	12oo	75,o	1,12	o,o93
9	männl.	51	68	6oo	156,6	2,35	o,39
1o	weibl.	46	6o	6oo	94,o	1,41	o,235
11	männl.	44	83	6oo	43,3	o,65	o,11
12	männl.	46	8o	6oo	98,o	1,47	o,245
13	männl.	29	66	12oo	139,o	2,o8	o,173
14	männl.	34	1o3	6oo	3o,o	o,45	o,o75
15	männl.	35	89	12oo	27,o	o,4o	o,o33

Tabelle 6: Tegretalausscheidung der Versuchspersonen mit Tegretaldauermedikation. Als tägliche Harnmenge wurden 15oo ml angenommen.

Versuchsperson	Tagesmedikation	Extinktion der Metaboliten in 1500 ml Harn					geschätzte Tagesausscheidung der Metaboliten in mg					geschätzte tgl. Gesamtausscheidung der Met. I-V in mg	tgl. Gesamtausscheidung der Met. I-V in % der tgl. Einnahme
		I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V		
1	600	126,0	27,0	148,0	--	13,4	3,3	0,70	3,89	--	0,35	8,24	1,37
2	600	112,0	45,0	230,0	--	9,0	2,9	1.17	6,07	--	0,23	10,37	1,73
3	600	22,5	97,0	nicht auswertb.	--	60,0	0,6	2,54	nicht auswertb.	--	1,56	4,69	0,78
4	600	60,0	150,0	"	--	97,0	1,56	3,94	"	--	2,54	8,04	1,34
5	1200	52,5	217,0	"	--	15,0	1,37	5,70	"	--	0,39	7,46	0,62
6	1000	240,0	585,0	"	--	150,0	6,30	15,30	"	--	3,94	25,54	2,55
7	1200	104,0	560,0	"	60,0	400,0	2,73	14,60	"	1,56	10,45	29,34	2,44
8	1200	292,0	18,0	"	157,0	750,0	7,65	0,47	"	4,08	19,60	31,80	2,65
9	600	36,0	18,0	"	--	--	0,94	0,47	"	--	--	1,41	0,23
10	600	45,0	94,0	"	--	--	1,17	2,45	--	--	--	3,62	0,60
11	600	98,5	237,0	--	--	--	2,57	6,20	--	--	--	8,77	1,46
12	600	235,0	345,0	--	--	--	6,15	9,00	--	--	--	15,15	2,52
13	1200	18,0	36,0	345,0	--	31,5	0,47	0,94	9,00	--	0,82	11,23	0,93
14	600	22,5	13,4	67,5	13,4	9,0	0,59	0,35	1,77	0,35	0,23	3,29	0,55
15	1200	625,0	116,0	785,0	215,0	72,0	16,4	3,05	20,5	5,62	1,88	47,45	3,95

Tabelle 7: Extinktionen der Tegretalmetaboliten I-V nach Tegretaldauermedikation in 1500 ml Harn. Auswertung mit Hilfe der Eichkurve für Tegretal. Geschlecht, Alter und Gewicht der Versuchspersonen sind Tab. 6 zu entnehmen.

D. Isolierung von Tegretal und seinen Metaboliten aus Harn und Versuche zur Identifizierung

1. Tegretal

In den Ausscheidungsversuchen mit Tegretal wurde die Substanz auf Grund ihres Rf-Wertes, ihres UV-Absorptionsspektrums und ihrer Anfärbbarkeit mit Sprühreagentien identifiziert.
Um ganz sicher zu gehen, daß tatsächlich die Extinktionen von Tegretal gemessen worden waren, wurde versucht, Tegretal aus Harn zu isolieren und an Hand seines Schmelzpunktes, seiner Kristalloptik und seines IR-Spektrums zu identifizieren.

a) Isolierung aus Harn

Die gesamte Harnmenge der Versuchspersonen 9 und 13 mit Tegretaldauermedikation wurde 12 Stunden lang mit dem Apparat nach KUTSCHER-STEUDEL bei p_H 12 mit Chloroform extrahiert. Der Extrakt wurde über Natriumsulfat getrocknet und dann das Chloroform vorsichtig auf dem Wasserbad abgedampft. Der Rückstand wurde in Aceton aufgenommen und mit Hilfe der präparativen Dünnschichtchromatographie aufgetrennt. Dazu wurde er mit dem Auftragegerät der Firma Desaga System Delft auf zwei große, mit Kieselgel HF_{254} (Merck) handgegossene Platten aufgetragen, über die je eine Glasplatte im Abstand von 0,5 cm gelegt wurde. So entstand die notwendige feuchte Kammer, da die 40 mal 20 cm großen Platten nur zu einem geringen Teil in dem 40 cm S-Kammertrog Desaga mit dem Fließmittel Chloroform + Aceton = 4 + 1 standen.
Nach der Auftrennung waren im gefilterten UV-Licht zu sehen:
eine blaßblaue Fluoreszenz bei Rf 0,25; eine Absorption bei Rf 0,4; eine schwach dunkelblaue Fluoreszenz bei Rf 0,65; eine blaßblaue Fluoreszenz bei

Rf o,78 und eine im Sichtbaren gelbbraune Absorption bei Rf o,9o.
Die mitaufgetragene Tegretalreinsubstanz wanderte nur bis zu einem Rf-Wert von o,25 und lag in Höhe der blaßblauen Fluoreszenz.
Eine geringe Menge der Kieselgelzonen bei Rf o,25 und Rf o,4o wurde abgeschabt, mit 3 ml o,5 n H_2SO_4 3o min. lang eluiert, filtriert und die UV-Absorptionskurve gemessen. Für die Substanz bei Rf o,4 ergab sich ein

A_{max} bei 257 nm und ein
A_{min} bei 267 nm.

Für die Substanz bei Rf o,25

A_{max} bei 296 und 257 nm und
A_{min} bei 267 und 247 nm.

Tegretal ließ sich also nicht nachweisen, auch nicht mit Muniers Reagens. Dagegen färbte sich die blaßblaue Fluoreszenz bei Rf o,25 mit Chlor/o-Dianisidin blau. Tegretal wurde also von einer blaßblau fluoreszierenden Substanz mit demselben Rf-Wert überdeckt. Es wurde schon gesagt, daß auf Grund der UV-Absorptionskurve von nach Tegretaleinnahme aus Harn extrahiertem Tegretal ein Metabolit in derselben Höhe zu vermuten ist, der sich nun bei den grösseren Konzentrationen störend bemerkbar machte.

Um eine inzwischen eingetretene Zersetzung des Harnes ausschließen zu können, wurde probeweise die in den Ausscheidungsversuchen übliche Harnmenge von 1o ml extrahiert. Die UV-Absorptionskurve verlief aber mit einem A_{max} bei 284 nm und einem A_{min} bei 255 nm normal.

Die gesamte Harnmenge der Versuchspersonen 4 und 5 mit Tegretaldauermedikation wurde in einem Parallelversuch mit Chloroform bei p_H12 (ohne Perforator nach KUTSCHER-STEUDEL) zweimal im Schütteltrichter extrahiert. Es bildete sich eine Emulsion, die erst durch mehrmaliges Zentrifugieren und Filtrieren beseitigt werden konnte.

Auch mit diesem Extrakt ergaben sich nach der präparativen Dünnschichtchromatographie gleiche Verhältnisse wie mit dem der Versuchspersonen 9 und 13.

In einem Zusatzversuch wurde als bestes Fließmittelgemisch zur Trennung von Tegretal und der als blaßblaue Fluoreszenz imponierenden Substanz Chloroform + Aceton = 1+1 ermittelt. Tegretal wanderte hierin bis Rf o,6o. Eventuell vorhandenes Coffein, das mit dem Laufmittel Chloroform + Aceton = 4+1 denselben Rf-Wert wie Tegretal hatte, konnte so auch mit abgetrennt werden, da es mit dem Laufmittel Chloroform + Aceton = 1+1 einen Rf von o,45 hatte.

Es wurden nun von sämtlichen präparativen Dünnschichtplatten die Kieselgelzonen der blaßblauen Fluoreszenz bei Rf o,25 abgeschabt und in der Apparatur nach HAANEN und BADUM mit Aceton eluiert. Das Eluat wurde nochmals mit der präparativen Dünnschichtchromatographie gereinigt. Als Fließmittel wurde nun also Chloroform + Aceton = 1+1 verwendet. Unter UV-Licht bei 254 nm war danach in Höhe der mitaufgetragenen Tegretalreinsubstanz die erwartete Absorption zu sehen, außerdem eine blaßblaue Fluoreszenz bei Rf o,67 und schwach blaue Fluoreszenzen bei Rf o,74 und Rf o,82.
Die UV-Kurve der Absorptionszone zeigte das gleiche Spektrum wie Tegretal. Diese Zone wurde nun abgeschabt, mit Aceton im Rückflußverfahren eluiert und das Eluat mit einem aschefreien Filterpapier aufgenommen. Die weitere Reinigung erfolgte in dem schon beschriebenen Vakuumsublimationsgerät. Es wurde eine Stunde lang bei 19o° sublimiert.

b) Kristalloptische Untersuchung des Vakuumsublimats.

Man sah im Sublimationsrohr 1o cm nach dem Rückstand Tropfen, 2o cm danach schmale, nadelförmige, stark verzweigte Prismen mit starker Doppelbrechung im polari-

sierten Licht. Nach 23 cm gelbe Rauten, die sehr starke Doppelbrechung 1. und 2. Ordnung zeigten (siehe Abb.16).

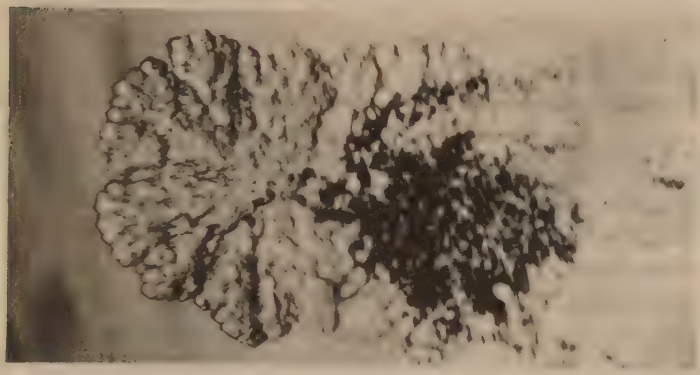

Abb. 16: Aus Harn isoliertes Tegretal.

c) Schmelzpunkt

Zur Schmelzpunktbestimmung wurden die Kristalle mit einem Mikrospatel aus dem Sublimationsrohr entfernt. Mit dem Kofler-Heiztischmikroskop wurde ein Schmelzpunkt von 193°C ermittelt.

Da von der Substanz nur sehr wenige Mikrokristalle gewonnen werden konnten, gelang es nicht, ein IR-Spektrum aufzunehmen.

2. Metabolit I

Zusammenfassend soll kurz über das Verhalten dieses Metaboliten berichtet werden:
Er ist auf Dünnschicht im gefilterten UV-Licht gut als schwach dunkelblaue Fluoreszenz zu sehen. Mit dem Laufmittel Chloroform + Aceton = 4+1 liegt sein Rf bei o,72.
Nicht nachzuweisen ist er mit den benützten Sprühreagentien.
Das Absorptionsmaximum liegt bei 254,5 nm, das Minimum bei

236 nm (siehe Abb. 1o). Er trat bei sämtlichen drei Versuchsreihen auf.

a) Isolierung aus Harn

Von den präparativen Dünnschichtplatten der Versuchspersonen 9 und 13 mit Tegretaldauermedikation wurde die Kieselgelzone der schwach dunkelblauen Fluoreszenz bei Rf o,65 abgeschabt und im Rückflußverfahren eluiert. Das Eluat wurde mit Hilfe der aufsteigenden Papierchromatographie nochmals gereinigt. Mit dem Fließmittel nach JATZKEWITZ (n-Butanol-15 proz. HCOOH-H_2O im Vol.-Verhältnis 12:1:7), das sich in einem Zusatzversuch als am besten geeignet erwies, ergab sich eine blaßblaue Fluoreszenz bei Rf o,8o und eine dunkelblaue bei Rf o,95, deren UV-Absorptionskurve im Sauren ein A_{max} bei 255 nm und ein A_{min} bei 234 nm zeigte . Das A_{max} verschob sich im Alkalischen auf 249 nm. Die dunkelblaue Fluoreszenzzone wurde wieder eluiert und im Vakuum 45 Minuten bei 18o° sublimiert.

b) Kristalloptische Untersuchung

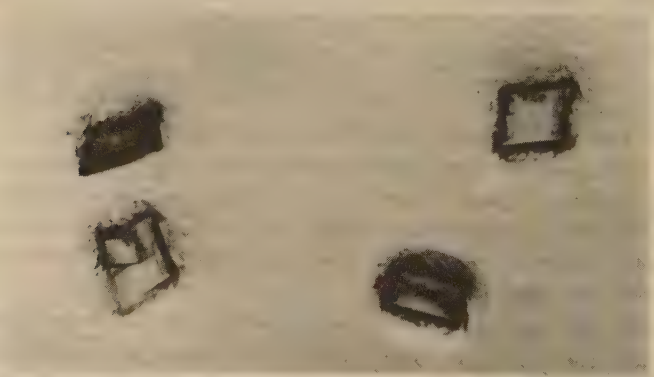

Abb. 17: Tegretal Metabolit I, isoliert aus Harn der Versuchspersonen 9 und 13 mit Tegretaldauermedikation.

Im Sublimationsrohr waren nahe dem Rückstand (2-5 cm) sehr kleine Rauten mit stärkerer Doppelbrechung zu sehen, dann gelbliche, sehr kleine Kristallskelette, dann ein farbloses Gemisch aus erstarrter Schmelze (siehe Abb. 17).
Die Kristalle hatten einen Schmelzpunkt von 271-274°C.

Die dunkelblaue Fluoreszenzzone der präparativen Dünnschichtplatten der Versuchspersonen 4 und 5 mit Tegretaldauermedikation wurde in derselben Weise behandelt.

Abb. 18: Tegretalmetabolit I, isoliert aus Harn der Versuchspersonen 4 und 5 mit Tegretaldauermedikation.

Im Sublimationsrohr waren in einem Abstand von 5 cm vom Rückstand prismatische Aggregate zu sehen, die mit gebogenen Kristallskeletten verwachsen waren (siehe Abb.18).

Der Schmelzpunkt der Kristalle lag bei 254-259°C.
Für ein IR-Spektrum reichte die gewonnene Substanz nicht aus.

3. Metabolit II

Dieser Metabolit ist nach Dünnschichtchromatographie mit dem Laufmittel Chloroform + Aceton = 4+1 im UV-Licht

bei 254 nm gut als blaßblaue Fluoreszenz mit dem Rf o,85 zu sehen. Er ist mit keinem der benützten Sprühreagentien nachzuweisen. Abb. 11 zeigt seine UV-Absorptionskurve. Auffällig ist das Auftreten der Nebenmaxima bei 353 und 336 nm. Der Metabolit erschien bei allen drei Versuchsreihen im Harn.

Die Isolierung erfolgte durch Aufarbeitung der blaßblauen Fluoreszenzzone der präparativen Dünnschichtplatten der Versuchspersonen 4, 5, 9 und 13 mit Tegretaldauermedikation, wie unter II, D 2a) geschildert wurde. Der Rf-Wert nach Papierchromatographie mit dem Fließmittel nach JATZKEWITZ lag bei o,82.
Bei der Vakuumsublimation wurden nur ganz geringe Mengen gewonnen, die für weitere Untersuchungen nicht ausreichten.

4. Metabolit III

Nach Dünnschichtchromatographie mit Chloroform + Aceton = 4+1 ist die Substanz schon im Sichtbaren bei Rf o,9o als gelbbraune Zone zu sehen. Sie färbte sich mit MUNIERs Reagens rot und mit Chlor/o-Dianisidin blaugrau bis orangebraun. Abb. 12 zeigt ihre UV-Absorptionskurve. Der Metabolit konnte beim 2. Selbstversuch nicht nachgewiesen werden.

Zur Isolierung wurde wie bei den Metaboliten I und II vorgegangen.

Im Sublimationsrohr schlugen sich lediglich gelbe, ölige Tropfen nieder. Ein damit angefertigtes IR-Spektrum war wegen der zu geringen Konzentration nicht auswertbar.

Die Metaboliten IV und V waren auf den präparativen Dünnschichtplatten nicht nachzuweisen.

5. Zusammenfassung der Versuche zur Isolierung und Identifizierung von Tegretal und seinen Metaboliten aus Harn.

Eine sichere Identifizierung von Tegretal oder einem seiner Metaboliten im Harn nach Einnahme von Tegretal an Hand von Kristalloptik und IR-Spektrum war nicht möglich.

Nach anfänglichen Schwierigkeiten war Tegretal gut zu isolieren; die Kristalloptik stimmte aber mit keinem der bei Vakuumsublimation von Tegretalreinsubstanz erhaltenen Kristallen genau überein. Es bestand aber doch eine gewisse äußere Ähnlichkeit zwischen dem isolierten Kristall (Abb. 16) und der orange-gelben Kristallfraktion nach Sublimation von Tegretal (Abb. 4). Neben der übereinstimmenden gelben Farbe ist außerdem der übereinstimmende Schmelzpunkt von 193°C zu bemerken.

Die orange-gelbe Kristallfraktion nach Vakuumsublimation von Tegretal zeigte dieselbe Farbe, denselben Schmelzpunkt und dieselben UV- und IR-Spektren wie das auf S. 51 erwähnte Iminostilben. So ist es denkbar, daß bei der Annahme einer Identität der beiden Substanzen bei einer Vakuumsublimation bei 190°C durch thermische Zersetzung aus Tegretal Iminostilben entsteht. Dies würde erklären, daß bei den Versuchen zur Isolierung des unverändert ausgeschiedenen Wirkstoffes zwar auf den Dünnschichtplatten nach dem Rf-Wert und der UV- Absorptionskurve Tegretal zu vermuten war, daß aber nach der zur Reinigung erforderlichen Vakuumsublimation keines mehr nachgewiesen werden konnte.

Auch eine Identifizierung der Tegretalmetaboliten scheiterte an den geringen Ausscheidungsmengen.

Wie auf S. 42 erwähnt, trat auf der präparativen Dünnschichtplatte bei Rf 0,40 eine Absorption im gefilterten

UV-Licht auf, die bei keinem der Extrakte von 1o ml Harn der drei Versuchsreihen aufgefallen war. Sie hatte sich auch mit keinem der angewandten Sprühreagentien angefärbt. Es könnte sich um einen VI. Metaboliten handeln, der nur in sehr geringer Konzentration auftritt und nur nach Extraktion von größeren Harnmengen nachzuweisen ist.

Im Sauren liegt A_{max} bei 257 nm und A_{min} bei 267 nm. Sein Rf-Wert nach Dünnschichtchromatographie mit Chloroform + Aceton = 1+1 lag bei o,85.

Wenn man noch als VII. Metaboliten die Substanz berücksichtigt, die nach Dünnschichtchromatographie mit Chloroform + Aceton = 4+1 einen Rf-Wert wie Tegretal hatte und dieses blaßblau fluoreszierend überdeckte, kann man sagen, daß mit der angewandten Methode 7 Metaboliten von Tegretal aus dem Harn extrahiert werden können.

E. Untersuchung eines möglichen Abbauproduktes von Tegretal und Synthese von Vergleichssubstanzen durch Hydrolyse von Tegretal.

Wie aus Abb. 1 hervorgeht, könnte beim Abbau von Tegretal der Azepinring gespalten werden und Stilben oder ein Stilbenderivat entstehen. Deshalb wurde das leicht zugängliche Stilben untersucht.
Zuerst wurde von der Substanz das UV-Absorptionsspektrum gemessen. Im Falle der Übereinstimmung mit dem eines Tegretalmetaboliten sollten weitere Untersuchungen folgen.

Zur Verfügung stand auch 2,4-Dinitro-stilben. Aus dieser Substanz kann über 2-Nitro-stilben das 2-Amino-stilben in 3 Synthesestufen gewonnen werden (BEILSTEIN). 2-Amino-stilben käme als Abbauprodukt von Tegretal sehr wahrscheinlich in Betracht.
Der Versuch, 2-Amino-stilben von Praktikanten im Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen darstellen zu lassen, gelang leider nicht.

1. Stilben

Stilben bildet farblose Kristalle mit dem Schmelzpunkt 124°, ist leicht löslich in Benzol und unlöslich in Wasser. Beim Bestrahlen mit UV-Licht geht es in die labile ölige cis-Form über, in das Isostilben (BEYER).

Die trans-Form wurde in o,5 n Schwefelsäure gelöst. Es bildete sich eine milchige Emulsion, die abfiltriert wurde. Das Filtrat wurde spektralphotometrisch gemessen. Es zeigte sich aber lediglich eine stetig ansteigende UV-Absorptionskurve ohne Maximum.
Unter Erhitzen löste sich Stilben gut in Methanol.
Die UV-Absorptionskurve zeigte folgende Charakteristik:

A_{max} bei 3o6 und 294 nm
A_{min} bei 3o3 und 243 nm,

stimmte also mit keiner UV-Absorptionskurve eines Tegretalmetaboliten überein.

2. Hydrolyse von Tegretal

Bei der Analysenanweisung für Tegretal der Firma Geigy AG. (siehe S.21) entsteht wahrscheinlich nach einer VAN SLYKE-Reaktion Iminostilben (5H-dibenz(b,f)azepin).

Da WEIST und ZICHA (1967) darauf hinweisen, daß sich einer der 7 Metaboliten, die sie aus Harn extrahierten, wie Iminostilben verhielt und da der Abbau von Tegretal nach Abb. 1 gut über oder zu dieser Substanz führen könnte, sollte nun durch Hydrolyse von Tegretalreinsubstanz Iminostilben oder eine ähnliche Substanz hergestellt und mit den Tegretalmetaboliten verglichen werden, um bei Übereinstimmung auf diesem Weg der Identifizierung der Tegretalmetaboliten näherzukommen.

Iminostilben wurde 1957 von der Firma Geigy AG. ent-

wickelt.+) Weitere Verfahren zur Herstellung gaben auch BERGMANN und RABINOVITZ (1960) und HUISGEN, LASCHTUVKA und BAYERLEIN (1960) an. Es ist eine gelbe Substanz, deren Schmelzpunkt nach SCHINDLER und BLATTNER (1961) bei 204-206°, nach CRAIG (1963) bei 196,5-198°C liegt. Ihr UV-Spektrum in Methanol zeigt A_{max} bei 355 nm, 292 nm (nur angedeutet) und 258 nm (SCHMIDT, 1962). Das Molekulargewicht beträgt 193,17.

a) Vorgang und Nachweis der entstehenden Substanzen

100 mg Tegretalreinsubstanz wurde mit 5 ml konz. HCl und 50 ml Wasser zwei Stunden lang gekocht. Das Hydrolysat wurde mit festem Ätznatron auf p_H 14 gebracht und zweimal mit jeweils der doppelten Menge an Chloroform ausgeschüttelt. Dieser alkalische Extrakt wurde über Na_2SO_4 getrocknet und das Chloroform im Wasserbad abgedampft. Der Rückstand wurde in Aceton gelöst und mit Hilfe der präparativen Dünnschichtchromatographie in dem Fließmittel Chloroform + Aceton = 4+1 aufgetrennt.

Danach waren unter UV-Licht bei 254 nm 6 Zonen zu sehen:
eine Absorption mit dem Rf-Wert 0,35 in Höhe der mitaufgetragenen Tegretalreinsubstanz; eine ganz schwache Absorption mit Rf 0,49; eine schwach blaßblaue Fluoreszenz bei Rf 0,58; eine dunkelblaue Fluoreszenz bei Rf 0,68; eine blaßblaue Fluoreszenz bei Rf 0,83 und eine im Sichtbaren gelbbraune Absorption bei Rf 0,95.

Die Substanzen bei Rf 0,35 und 0,83 färbten sich mit MUNIER's Reagens rot, mit Chlor/o-Dianisidin blaurot bis rot und reduzierten $KMnO_4$. Die Substanz bei Rf 0,95 färbte sich mit Chlor/o-Dianisidin blau und reduzierte $KMnO_4$. Die übrigen Substanzen reagierten mit keinem der verwendeten Sprüh-

+) I.R. Geigy AG., Belg.Pat. 562302, 12.11.1957

reagentien.

Bei den folgenden Untersuchungen interessierten u.a. die nach dem ungefähren Rf-Wert und dem Aussehen unter gefiltertem UV-Licht mit den Tegretalmetaboliten I, II und III eventuell identischen Substanzen bei Rf o,68, o,83 und o,95.

b) Substanz mit Rf-Wert o,95

Sowohl chromatographisch als auch nach dem Aussehen unter UV-Licht und dem Verhalten gegenüber Sprühreagentien und ihrem Rf-Wert verhielt sich diese Substanz wie der aus Harn isolierte Tegretalmetabolit III.
Die betreffende Kieselgelzone wurde von der präparativen Dünnschichtplatte abgeschabt und in der Apparatur nach HAANEN und BADUM mit Aceton eluiert und das Eluat im Vakuum 45 Minuten bei 190° sublimiert.

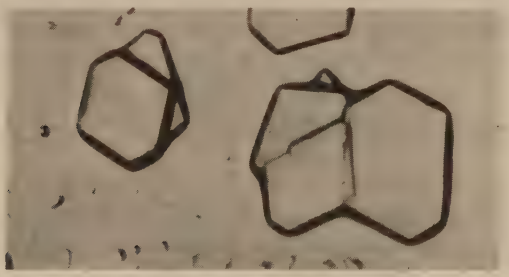

Abb. 19: Tegretalhydrolysat mit RF o,95 nach Dünnschichtchromatographie mit Chloroform + Aceton = 4+1, Elution und Vakuumsublimation.

Im Sublimationsrohr war 5-15 cm nach dem Rückstand eine goldgelbe Fraktion aus schönen Kristallen mit vorwiegend rhombischer Grundfläche zu sehen. Es handelte sich um dünne Plättchen mit Parallelverwachsungen und starken Farben im polarisierten Licht. Danach folgte eine gelbe Tröpfchenfraktion, die nachträglich

auskristallisierte.

Der Schmelzpunkt lag bei 198-2oo°C.

Die UV-Absorptionskurve (siehe Abb. 12) hatte ein

A_{max} bei 258 nm

A_{min} bei 235,5 mn, gemessen in Methanol.

Sie hatte also denselben Verlauf wie die von Iminostilben.

Abb. 2o zeigt das IR-Spektrum der Substanz. Es stimmt ebenfalls mit dem von Iminostilben überein.

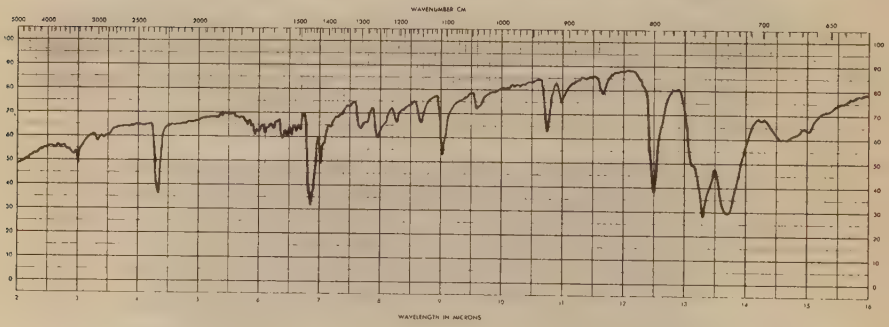

Abb. 2o: IR-Spektrum der Substanz mit dem Rf-Wert o,95 nach Hydrolyse von Tegretalreinsubstanz.

Da viel Substanz gewonnen wurde, konnte ein Massenspektrum angefertigt werden.+) Das Molekulargewicht betrug 193.

Da Massenspektrum, IR-Spektrum, UV-Absorptionskurve und Schmelzpunkt mit den Konstanten des Iminostilben übereinstimmen, darf angenommen werden, daß die bei der Hydrolyse von Tegretalreinsubstanz erhaltene Substanz und das

+) Ich danke der freundlichen Unterstützung von Dr. J. Heiß, Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen.

Iminostilben identisch miteinander sind.

Der aus Harn isolierte Tegretalmetabolit III verhielt sich chromatographisch nach Aussehen im gefilterten UV-Licht, nach dem Rf-Wert und nach dem im Sichtbaren gelben Aussehen sowie nach dem UV-Absorptionsspektrum wie diese Substanz. Da aus Harn nur wenig Substanz gewonnen werden konnte, mußte auf den sicheren Beweis durch Bestimmung des Schmelzpunktes, des IR-Spektrums und des Massenspektrums verzichtet werden. Auf Grund der genannten übereinstimmenden Kriterien liegt aber der Verdacht nahe, daß es sich bei diesem Metaboliten um Iminostilben handelt.

c) Substanz bei Rf-Wert o,83

Nach Rf-Wert und Fluoreszenz im gefilterten UV-Licht nach Chromatographie mit dem Laufmittel Chloroform + Aceton = 4+1 verhielt sich diese Substanz wie der Tegretalmetabolit II. Trotz nochmaliger Reinigung durch Papier-und Dünnschichtchromatographie war sie sehr unrein.
Deshalb wurde noch eine Hydrolyse von Tegretal durchgeführt, dieses Mal mit konz. Schwefelsäure. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie bei der Hydrolyse mit konz.HCl.

Nach der Auftrennung mit der präparativen Dünnschichtchromatographie zeigte sich unter UV-Licht bei 254 nm eine im Sichtbaren gelbe Absorption bei Rf o,95, eine blaßblaue Fluoreszenz bei Rf o,81 und eine schwache dunkelblaue Fluoreszenz bei Rf o,63.
Die Zone der blaßblauen Fluoreszenz bei Rf o,81 wurde mit Aceton eluiert und papierchromatographisch mit dem Fließmittel nach JATZKEWITZ noch einmal aufgetrennt. Eine blaßblaue Fluoreszenz bei Rf o,82 zeigte dieselbe UV-Absorptionskurve wie der Tegretalmetabolit II (siehe Abb. 11). Die betreffende Zone wurde eluiert und im Vakuum sublimiert. Das Sublimat war tröpfchenförmig und konnte deshalb nicht weiter untersucht werden.

d) Substanz bei Rf-Wert o,68

Diese Substanz verhielt sich wie der Tegretalmetabolit I. Für die weitere Untersuchung wurde die bei der Hydrolyse mit konz. H_2SO_4 gewonnene Substanz bei Rf o,63 verwendet. Sie wurde eluiert und nochmal papierchromatographisch mit dem Laufmittel nach JATZKEWITZ gereinigt. Der Rf lag dabei bei o,95. Das UV-Absorptionsspektrum (siehe Abb. 1o) entsprach dem des Tegretalmetaboliten I.

Es wurde 45 Minuten bei 18o° im Vakuum sublimiert. Im Sublimationsrohr waren 1o cm nach dem Rückstand sehr kleine, farblose, angeschmolzene Kristalle zu sehen, auf die gelbliche, unregelmäßig verwachsene Rauten und Prismen folgten. Für weitere Untersuchungen wurde zu wenig Substanz gewonnen.

III DISKUSSION

Die zunehmende Verwendung von Tegretal bei der Behandlung der Epilepsie, der Trigeminusneuralgie und neuerdings verschiedener innersekretorischer Erkrankungen bringt die Gefahr von Vergiftungen mit sich, weshalb die Nachweismöglichkeiten von Tegretal und seinen Metaboliten für den forensischen Toxikologen von Bedeutung sind.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Nachweis der Ausscheidung von Tegretal und seinen Metaboliten im Harn.

Zunächst wurden in Vorversuchen die chemischen und physikalischen Eigenschaften von Tegretal untersucht und die besten Extraktionsbedingungen aus Harn ermittelt.

Tegretal löste sich am besten in Chloroform.
Die UV-Absorptionskurve zeigte ein vom p_H-Wert unabhängiges A_{max} bei 284 nm und ein A_{min} bei 255 nm.

Bei der Vakuumsublimation der von der Firma Geigy gelieferten Reinsubstanz mit dem Schmelzpunkt von 193 - 194°C entstanden drei Kristallarten: einmal weisse bis gelbliche Drusen mit einem Schmelzpunkt von 203°C, und den UV- und IR-Spektren der nicht sublimierten Tegretalreinsubstanz, dann einzelne polygonale, isometrische farblose Kristalle, deren Schmelzpunkt 189-190°C betrug, deren UV-Absorptionskurve A_{max} bei 272 nm und A_{min} bei 243 nm hatte und deren IR-Spektrum sich nicht wesentlich von dem der Tegretal-Reinsubstanz unterschied, und schließlich noch orange-gelbe Kristalle mit einem Schmelzpunkt von 193-194°C, und UV- [A_{max} bei 252 nm und 283 nm (nur angedeutet) und A_{min} bei 237 nm] und IR-Spektren wie Iminostilben.

Wichtigstes Ergebnis der Sublimationsversuche war, daß aus Tegretal bereits durch thermische Zersetzung im Vakuum bei 190°C Iminostilben entstand. Dies erklärt, warum bei den Versuchen zur Isolierung von Tegretal aus Harn kein unverändertes Tegretal gefunden wurde. Aus der Tatsache, daß nach der Vakuumsublimation vorher nicht vorhandenes Iminostilben nachgewiesen werden konnte, läßt sich schließen, daß Tegretal ursprünglich unverändert im Harnextrakt vorgelegen haben könnte.

Nach Papierchromatographie mit dem Fließmittel nach ALGERI und WALKER war Tegretal bis zu einer unteren Grenze von 50 Gamma bei Rf 0,85 als Absorption im UV-Licht zu sehen. Bei Besprühen mit MUNIER's Reagens trat ab 50 Gamma eine Rotfärbung auf.

Mit der Dünnschichtchromatographie und dem Fließmittel Chloroform + Aceton = 4+1 war Tegretal besser nachzuweisen. Schon ab 0,5 Gamma war eine Absorption bei Rf 0,35 unter UV-Licht wahrzunehmen, ebenso eine Blaugrau-orange-braun-Färbung nach Behandeln mit Chlor/o-Dianisidin. Bei Besprühen mit MUNIER's Reagens färbte es sich bis zu 10 Gamma rotbraun. Der von SCHEIFFARTH, WEIST und ZICHA (1966) angegebene Nachweis mit 70-proz. Perchlorsäure ist aber noch empfindlicher.

Das Besprühen der Chromatogramme mit $Hg_2(NO_3)_2$, $FeCl_3$, HAUCK'schem und EHRLICH'schem Reagens ergab keinerlei Reaktion.

Tegretal wird aus Harn am besten mit Chloroform bei p_H 14 extrahiert. Nach papierchromatographischer Auftrennung und Elution mit 0,5 proz. Boratpuffer betrug die Ausbeute 81,5%. Bei Extraktion aus Wasser und Papierchromatographie betrug sie nur 77,5%.

Bei niedrigen Tegretalkonzentrationen im Harn war die papierchromatographische Auftrennung zu unempfindlich, weshalb beim Nachweis von Tegretal die Dünnschichtchromatographie verwendet wurde. Der Verlust durch Dünnschichtchromatographie und Elution mit Boratpuffer lag mit 24% höher als bei der Papierchromatographie, was einleuchtet, wenn man die nicht zu umgehende Beschädigung der Kieselgelschicht und die daraus folgenden Verluste bedenkt.

In den Hauptversuchen zur quantitativen Bestimmung der unverändert ausgeschiedenen Tegretalmenge trat schon drei Stunden nach Tegretaleinnahme auf den Dünnschichtchromatogrammen unter UV-Licht eine Absorption bei Rf o,35 in Höhe der mitaufgetragenen Tegretal-Reinsubstanz auf, die noch 69 Stunden nach Versuchsbeginn zu sehen war. Nach Behandeln mit Chlor/o-Dianisidin färbte es sich blaugrau bis orangebraun, mit MUNIER's Reagens ergab sich eine Rotbraunfärbung. Die UV-Absorptionskurven zeigten ein Maximum und Minimum wie Tegretal, es trat aber zusätzlich ein Maximum bei 258 nm auf. Dieses rührte von einer Substanz her, die nach Extraktion größerer Harnmengen die Tegretalzone blaßblau fluoreszierend überdeckte und durch Dünnschichtchromatographie mit dem Fließmittel Chloroform + Aceton = 1+1 von Tegretal abgetrennt werden konnte.
Die quantitative Bestimmung der Ausscheidung erfolgte durch Messung der Extinktionen und deren Auswertung mit Hilfe der in Vorversuchen aufgestellten Eichkurven.

Von den aufgenommenen 4oo mg Tegretal wurden in diesen 69 Stunden o,35% unverändert mit dem Harn ausgeschieden, in Übereinstimmung mit den Versuchen von FÜHR (1964), und im Gegensatz zu dem Bericht von BRAUNHOFER und JESCH (1964), die eine vollständige Tegretalausscheidung mit dem Harn innerhalb 6 Stunden angaben.
Auch die Harnausscheidung von unverändertem Tegretal bei Tegretaldauermedikation lag unabhängig von der Dosierung mit o,o3-o,39%in derselben Größenordnung.

Auf den Dünnschichtchromatogrammen, mit denen die einzelnen extrahierten Harnportionen nach Tegretal-aufnahme aufgetrennt wurden, waren unter UV-Licht verschiedene Substanzflecke zu sehen, die bei Extraktion von Leerharn nicht zu finden waren. Es handelte sich demnach offenbar um Metaboliten von Tegretal.

Metabolit I imponierte als schwache dunkelblaue Fluoreszenz bei Rf o,72, Metabolit II als blaßblaue Fluoreszenz bei Rf o,85, Metabolit III als im Sichtbaren gelbe Absorption bei Rf o,9o, Metabolit IV als blaßblaue Fluoreszenz bei Rf o,18 und Metabolit V ebenfalls als blaßblaue Fluoreszenz bei Rf o,53.

Metabolit III reduzierte $KMnO_4$, färbte sich durch Besprühen mit MUNIER's Reagens rot und zeigte nach Behandeln mit Chlor/o-Dianisidin Blaugrau-orangebraunfärbung. Die anderen Metaboliten reagierten nicht mit den verwendeten Sprühreagentien.

Von den Metaboliten wurden die UV-Extinktionen gemessen. Wenn man für die Auswertung die Eichkurve für Tegretal benützt, wurden beim ersten Selbstversuch von den aufgenommenen 4oo mg Tegretal o,o9% als Metabolit I, o,33% als Metabolit II und o,13% als Metabolit III ausgeschieden. Zusammen mit den o,2% an unverändert ausgeschiedenem Tegretal ergibt sich, daß nach Tegretalaufnahme mit dem Harn weniger als 1% unverändert oder als Abbauprodukte eliminiert werden.

Beim zweiten Selbstversuch wurden von dem eingenommenen Tegretal o,o9%als Metabolit I, o,oo9% als Metabolit II und o,69% als Metabolit IV ausgeschieden, wobei zu berücksichtigen ist, daß der Metabolit II ab der 23. Stunde nach Einnahme zwar nachweisbar, aber seine Extinktion

nicht meßbar war. In Übereinstimmung mit dem ersten Selbstversuch wurden wieder nur ca. 1% der aufgenommenen Tegretalmenge unverändert oder als Metaboliten mit dem Harn ausgeschieden.

Was diese geringen Ausscheidungsmengen betrifft, wurden die Erfahrungen von WEIST und ZICHA (1967) bestätigt. Sie hatten nach Applikation von 600 mg Tegretal eine maximale Konzentration von noch nicht einmal ein Gamma pro ml Tegretal und einem Metaboliten gefunden. Ein zweiter Metabolit erreichte eine Konzentration von ca. 5 Gamma pro ml, wobei die Auswertung nach der für Tegretal erstellten Eichkurve erfolgte.

Für den Ausscheidungsgipfel von Tegretal und seinen Metaboliten ergab sich eine interessante Verschiebung. Beim ersten Selbstversuch lag der Gipfel von Tegretal schon in den ersten drei Stunden, von Metabolit I zwischen der 12. und 21. Stunde, von den Metaboliten II und III zwischen der 24. und 29. Stunde nach Tegretaleinnahme. Die Metaboliten IV und V traten überhaupt nicht in Erscheinung.

Beim zweiten Selbstversuch lag der Gipfel für Tegretal zwischen der 5. und 9. Stunde, für die Metaboliten I und II zwischen der 9. und 16. Stunde und für den Metaboliten IV zwischen der 23. und 30. Stunde nach Versuchsbeginn. Die Metaboliten III und V waren während des gesamten Versuchs nicht nachzuweisen.

Der Metabolit V trat nur bei Tegretaldauermedikation auf.

Die Höhe der Ausscheidung der Tegretalabbauprodukte war bei Tegretaldauermedikation von der Dosierung unabhängig.

Welcher der gefundenen Metaboliten das Hauptausscheidungsprodukt von Tegretal ist, ließ sich nicht feststellen, da die einzelnen Metaboliten in allen drei Versuchsreihen in sehr unterschiedlichen Mengen ausgeschieden wurden.

Trotz zahlreicher Versuche konnte aus Harn lediglich der Metabolit I mit Hilfe der präparativen Dünnschichtchromatographie und der Vakuumsublimation als Kristall isoliert werden. Für eine Identifizierung an Hand des IR- und Massenspektrums reichte die Substanz nicht aus, was unter Berücksichtigung der geringen Ausscheidungsmengen nicht verwundert.

Bei diesen Versuchen wurden aber zwei weitere Metaboliten von Tegretal gefunden, die wahrscheinlich in sehr niedrigen Mengen ausgeschieden werden und mit der verwendeten Methode nur nach Extraktion größerer Harnmengen nachgewiesen werden können. Nach der präparativen Dünnschichtchromatographie mit dem Fließmittel Chloroform + Aceton = 4 + 1 trat als Metabolit VI eine Absorption bei Rf o,4o und als Metabolit VII die schon erwähnte blaßblaue Fluoreszenz bei Rf o,35 in Höhe von Tegretal auf.

Stilben konnte auf Grund seiner UV-Absorptionskurve als Abbauprodukt von Tegretal ausgeschlossen werden.

Die Synthese von 2-Aminostilben, ebenfalls einem möglichen Metaboliten von Tegretal, gelang nicht.

Bei der Hydrolyse von Tegretal-Reinsubstanz entstand eine gelbe Substanz, die an Hand von Aussehen, UV-Absorptionsspektrum, Schmelzpunkt, IR- und Massenspektrum als Iminostilben identifiziert werden konnte.

Da sich der Metabolit III nach Aussehen, Anfärbbarkeit mit verschiedenen Reagentien, Rf-Wert und UV-Absorptionsspektrum wie Iminostilben verhielt, sind beide Substanzen wahrscheinlich identisch; ein sicherer Nachweis für diese Annahme konnte nicht erbracht werden, da von dem Metaboliten III zu wenig Substanz aus Harn isoliert werden konnte. Auch WEIST und ZICHA (1967) hielten einen Tegretalmetaboliten im Harn für Iminostilben.

Durch die zwei Stunden dauernde Hydrolyse von Tegretal-Reinsubtanz wurde nicht alles Tegretal in Iminostilben umgewandelt. Es entstanden noch zwei weitere Substanzen, die sich ähnlich wie die Tegretalmetaboliten I und II verhielten. Eine eingehende Untersuchung konnte aber nicht durchgeführt werden, da nach Reinigung mit Dünnschicht- und Papierchromatographie und Vakuumsublimation zu wenig Substanz zurückblieb.

Die Untersuchungen über Tegretal sollten fortgesetzt werden, denn ein Arzneimittel ist erst dann überschaubar, wenn man seine Metaboliten kennt. Im allgemeinen sind Abbauprodukte weniger wirksam, es gibt aber auch solche mit erhöhter Wirkung und vor allem mit erhöhter Nebenwirkung. So ist zum Beispiel noch zu prüfen, ob bei jahrelangem Gebrauch von Tegretal keine vitalen Schäden auftreten oder ob das Mittel bei Schwangeren nicht zu fetalen Mißbildungen führt. BRAUNHOFER und ZICHA (1966) beschreiben zwei Patientinnen, die bei Tegretaleinnahme während der ganzen Schwangerschaft gesunde Kinder zur Welt brachten, so daß man bei der geringen Toxizität im Tierversuch (STENGER und ROULET, 1964) annehmen kann, daß Tegretal auch bei jahrelanger Dosierung keine vitalen Schäden verursacht.

IV. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wird über die Ausscheidung und Nachweisbarkeit von Tegretal und seinen Metaboliten im menschlichen Harn berichtet.

Auf Dünnschichtchromatogrammen konnte Tegretal bis zu einer unteren Nachweisgrenze von o,5 Gamma als Absorption im gefilterten UV-Licht oder als Blaugrau-orangebraunfärbung mit Chlor/o-Dianisidin nachgewiesen werden.

Für die Extraktion von Tegretal aus Harn und die quantitative Bestimmung seiner Ausscheidung wurde eine kombinierte dünnschichtchromatographisch-spektrophotometrische Methode erarbeitet.

Nach Aufnahme einer Einzeldosis von 4oo mg Tegretal wurden innerhalb 69 Stunden nur o,35% der eingenommenen Menge unverändert ausgeschieden. Der Ausscheidungsgipfel lag in den ersten 9 Stunden nach der Aufnahme.

Mit der angegebenen Methode wurden 7 Tegretalmetaboliten im Harn gefunden, deren Gesamtausscheidung ungefähr o,7% der eingenommenen Tegretalmenge betrug. Die Ausscheidungsgipfel der Metaboliten I-IV folgten in einem Abstand von mehreren Stunden aufeinander. Der Metabolit V trat nur bei Tegretaldauermedikation auf; die Metaboliten VI und VII konnten nur nach Extraktion größerer Harnmengen nachgewiesen werden, wobei der Metabolit VII die Tegretalzone blaßblau fluoreszierend überdeckte.

Auch bei Tegretaldauermedikation wurden nur sehr geringe Mengen Tegretal und Tegretalabbauprodukte ausgeschieden, die von der Dosierung unabhängig waren.

Metabolit I wurde als Kristall aus Harn isoliert.

Metabolit III verhielt sich wie Iminostilben.

Stilben konnte als Abbauprodukt von Tegretal ausgeschlossen werden.

Eine bei der Hydrolyse von Tegretalreinsubstanz gewonnene gelbe Substanz wurde als Iminostilben identifiziert. Außerdem entstanden zwei weitere Substanzen, die sich ähnlich wie die Metaboliten I und II verhielten.

V. LITERATURVERZEICHNIS

1 ALGERI, E.J. and WALKER, J.T. — Paper chromatographie for identification of the common barbiturates. Amer.J.clin.Path. 22, 37 (1952)

2 ALNAES, R. — Behandlung epileptischer Zustände bei psychiatrischen Krankheitsbildern. Klinische Erfahrungen mit einem neuen Psychopharmakon (Tegretal®). Arch.psych.u.Z.Neur. 207, 99-105(1965)

3 AMOLS, W. — Wirksames Analgetikum bei Trigeminusneuralgien. Referat vor der Jahrestagung der American Neurological Association. Med.Tribune Nr. 27, 3-4 (1966)

4 BAUER, H. und MOLL, H. — Die organische Analyse. 4. Auflage, Leipzig, Akad.Verlagsges. Geest und Portig KG 1960

5 BECKER, R. und BALSHÜSEMANN, T. — Zur Behandlung des Gesichtsschmerzes. Dtsch.med.Wschr. 90, 2014-2020(1965)

6 BEHRENS, M. und FISCHER, A. — Zerlegung von Stoffgemischen und Identifizierung von chemischen Substanzen durch Verdampfung und Kondensierung in einem Wärmegradienten. Naturwissensch. 41, 1(1954), zit. BURGDORF

7 BEILSTEIN — Handbuch der organischen Chemie. 4. Aufl., Bd.XII, Verlag J.Springer, Berlin 1937

8 BERGMANN, E.D. and RABINOVITZ, M. — 5-Dibenzo(b,f)azepine J. org.Chemistry 25, 827-828 (1960)

9 BEYER, H. — Lehrbuch der organischen Chemie. 11./12. Auflage, Leipzig: S.Hirzel 1966

1o	BIRD, C.A.K., B.P. GRIFFIN, J.M. MIKLASZEWSKA and A.W.GALBRAITH	Tegretol (Carbamazepine): A Controlled Trial of a New Anti-Convulsant. Brit. J. Psychiat. 112, 737-742 (1966)
11	BLOM, S.	Trigeminal Neuralgia: Its Treatment With A New Anticonvulsant Drug (G-32883). Lancet I, 839-84o (1962)
12	BLOM, S.	Zur Behandlung der genuinen Trigeminusneuralgie mit einem neuen Antikonvulsivum: Erfahrungen mit G 32883 Arch. Neurol. (Chic.) 9, 285-29o (1963)
13	BONDUELLE, M. BOUYGUES, P., SALLOU, C. et CHEMALY, R.	Bilan de l'expérimentation clinique de l'antiépileptique G 32883 (5-Carbamoyl-5 H-dibenzo(b,f)azépine): résultats de 89 observations. III.Kongr. Coll. int. neuropsychopharmacol., München 1962
14	BONDUELLE, M. et SALLOU, C.	Tégrétol (Geigy). Thérapie 18, 543-548 (1963)
15	BONDUELLE, M. BOUYGUES, P. and SALLOU, C.	Clinical trial of the anti-convulsant G 32883, Tegretol (5-carbamoyl-5-H-dibenzo(b,f)azepine). Results of 1oo cases observed in 3 years. Electroenceph. clin. Neurophysiol. 17, 716-723 (1964)
16	BONDUELLE, M. HOUDART, R., SIGWALD, J. BOUYGUES, P. et LORMEAU, G.	Traitement medical efficace de la Névralgie Faciale par un dérivé de l'iminostilbène. Presse Méd. 32, 19o5-19o8 (1964)

17 BRAUNHOFER, J. — Klinische Erfahrungen mit Tegretal®, 5-Carbamyl-5H-dibenzo(b,f,)azepin (G 32883-Geigy), einer neuen antiepileptisch wirksamen Substanz. Med.Klin. 6o, 343-348 (1965)

18 BRAUNHOFER, J. und JESCH, W. — Klinische Erfahrungen mit einem neuen Dibenzazepinderivat (G 32883) in der Behandlung der Trigeminusneuralgie. Med. Welt 1964, 2oo-2o3

19 BRAUNHOFER, J., WEIST, F., ZICHA, L. und SCHMID, R. — Ergebnisse klinischer und klinisch-chemischer sowie elektrophoretischer Untersuchungen über ein neues Dibenzazepinderivat. 8th Intern. Congress of Neurology, Wien, September 5-1o., 1965

2o BRAUNHOFER, J. und L. ZICHA — Eröffnet Tegretal neue Therapiemöglichkeiten bei bestimmten neurologischen und endokrinen Krankheitsbildern? Med.Welt 1966, 1875-188o

21 BURGDORF, W. — Untersuchungen über die Größe der Diäthoxalsäureausscheidung im Harn und über die Veränderungen der Diäthoxalsäure und des Adalins bei der experimentellen Harnfäulnis. Med. Dissertation, Erlangen 1958.

22 BURKE, W.J.G., J.M.F. GRANT and G. SELBY — The Treatment of Trigeminal Neuralgia: A Clinical Trial of Carbamazepine ("Tegretol") Med.J.Aust.52/I : 494-498 (1965)

23 CRAIG, P.N. — US 3,o74,931 (Cl 26o-239)Jan.22, 1963 Appl. Oct.7, 1957, 8 pp. zit.Chemical Abstracts 59,39oo g(1963)

24 DAVIS, E. — Clinical Evaluation Of A New Anticonvulsant, G. 32883. Med.J.Aust. 51, 15o-152 (1964)

25 EKBOM, K. — Tegretol, a new Therapy of Tabetic Lightning Pains. Preliminary report. Acta Med. Scand. 179, 251-252 (1966)

26 FUCHS, P. — Ein Beitrag zur konservativen Therapie der Trigeminusneuralgie und verwandter Schmerzzustände. (Klinische Untersuchungen eines Dibenzazepinderivates im einfachen Versuch und im doppelten Blindversuch). Dtsch.Zahnärztebl. 19, 353-357 (1965)

27 FÜHR, J. — Untersuchungen über die Verträglichkeit und Ausscheidung eines neuartigen Antiepileptikums. Arzneim. Forsch. 14, 74-75 (1964)

28 GERAUD, J., A. RASCOL, L. GLEIZES et J. BENAZET — Traitement de la névralgie du trijumeau par le G. 32883. Ann. méd.-psychol. 122/I,: 474(1964)

29 GÜNTELBERG, E. — Epilepsiebehandlung med et nyt Farmakon, G. 32883. Ugeskr. Laeg. 126, 1326-1329 (1964)

3o HAAS, R. und W. LAUBICHLER — Indikation für Tegretol® in der Epilepsiebehandlung. Wiener Med.Wschr. 117, 357-361 (1967)

31 HAGEN, K. und RICHTER, U. — Therapeutische Erfahrungen mit einem neuartigen Antiepileptikum bei Kindern und Jugendlichen. Nervenarzt 35, 312-314 (1964)

32 HANDLEY, R. and A.S.R. STEWART — Mysoline: a new drug in the treatment of epilepsy. Lancet, I, 742 (1952)

33 HANEKE, K. — Tegretal® bei kindlichen Anfallsleiden. Med.Klin. 61, 8o4-8o7 (1966)

34 HAUCK, G. — Einfacher papierchromatographischer Nachweis von Coffein. Vortrag anläßl. der 41. Tagg der Dtsch.Ges. f.gerichtl.und soz.Medizin in Münster 1962. Ref.Arch.Kriminol. 131, 1o9 (1963)

35 HEINTEL, H. — Einwirkung verschiedener Antiepileptika auf einen mehrwöchigen Status epilepticus. Zbl. ges. Neurol.Psychiatr. 18o,7 (1965)

36 HERNANDEZ-PEON, R. — Anticonvulsive Action of G 32883. III. Kongr. CINP, München 1962

37 HERNANDEZ-PEON, R. — Central Action of G-32883 Upon Transmission of Trigeminal Pain Impulses. Med. Pharmacol.exp. 12: 73-8o (1965)

38 HERRMANN, B. und R. PULVER — Der Stoffwechsel des Psychopharmakons Tofranil. Arch.int.Pharmakdyn. 126, 454-469 (196o)

39 HESS, R. — Diskussionsbemerkung, Jahrestag. Dtsch.Sekt.d.Intern.Liga gegen Epilepsie, Bonn 1965.

40 HEYCK, H. — Fortschritte der Erforschung und Therapie chronischer Kopf- und Gesichtsschmerzen. Ther.d.Gegenw. 1965: 894-903

41 HEYCK, H. — Therapie der Trigeminusneuralgie. Dtsch.Med.Wschr. 92, 447-448 (1967)

42 HUISGEN, R., E. LASCHTUVKA, and F. BAYERLEIN — 2.3; 6.7-Dibenzo-azepin. Chem. Ber. 93, 392-397 (1960)

43 JAHNKE, E. und JAHNKE, E. — Beitrag zur Therapie der Trigeminusneuralgie. Med. Welt 1965: 1073-1074

44 JACOBS — Über das Antiepileptikum Tegretal® aus pädopsychiatrisch-neurologischer Sicht. Med. Klin. 59,: 1070-1071 (1964)

45 JATZKEWITZ, H. — Ein klinisches Verfahren zur Bestimmung von basischen Suchtmitteln im Harn. Hoppe-Seylers Z.physiol.Chemie, 292, 92 (1953)

46 JONGMANS, J.W.M. — Report on the Anti-Epileptic Action of Tegretol. Epilepsie 5, 74-82 (1964)

47 KETZ, E. — Tegretol® - ein neues Antiepileptikum. Praxis 53, 264-269 (1964)

48 KETZ, E. — Zur konservativen Behandlung der Trigeminusneuralgie. Med. Welt 1967: 2286-2295

49 KÖLE, H. und G. ZISSER — Erste klinische Erfahrungen mit der Tegretol-Medikation bei der genuinen Trigeminusneuralgie. Wiener klin.Wschr. 78,: 425-427 (1966)

5o KRUEGER, H.-J. — Klinischer Beitrag zur Therapie der Epilepsie mit einem Azepinderivat. Med. Welt 1964: 14o7-1413

51 KRUEGER, W. — Über Nebenwirkungen eines Azepinderivats (Tegretal®) Med. Klin. 61, 674-676 (1966)

52 LAPIERRE, V. et THIRY, S. — Premiers résultats du traitement de la névralgie essentielle du trijumeau par un dérivé de l'iminostilbène, le G 32883 ou tégrétol. Ann.méd.-psychol. 122,: 267-268 (1964)

53 LORGÉ, M. — Über ein neuartiges Antiepileptikum der Iminostilbenreihe (G 32883). III. Kongr. CINP, München 1962

54 LORGÉ, M. — Klinische Erfahrungen mit einem neuen Antiepileptikum, Tegretol (G 32883), mit besonderer Wirkung auf die epileptische Wesensveränderung. Schweiz.med.Wschr. 93, 1o42-1o47 (1963)

55 LUSTIG, B. — Über Behandlungsergebnisse mit dem neuen Antiepileptikum G 32883. Med.Welt 1964: 2o3-2o4

56 LUSTIG, B.
Über Behandlungsergebnisse mit dem neuen psychotropen Antiepileptikum Tegretal.
Med. Welt 1967: 1100-1101

57 MARTIN, F., M. MOVARREKHI et M.G. GISIGER
Etude de quelques effets du Tégrétol sur une population d'enfants épileptiques.
Schweiz.med.Wschr. 95, 982-989(1965)

58 MERTENS, H.-G.
Symposium über progressive Muskeldystrophie, Myotomie, Myasthenie anläßlich der 125. Wiederkehr des Geburtstages von Wilhelm Erb.
Heidelberg 30.11.-4.12.65.

59 MÜLLER, H.A.
Ein neuartiges Antiepileptikum bei chronisch anstaltsbedürftigen Epileptikern.
Nervenarzt, 34, 463-464 (1963)

60 IM OBERSTEG, J. und J. BÄUMLER
Suicid mit dem Psychopharmakon Tofranil.
Arch.f.Tox. 19, 339-344 (1962)

61 PAKESCH, E.
Untersuchungen über ein neuartiges Antiepileptikum.
Wien.med.Wschr. 113, 794-796 (1963)

62 Pouyanne, H., P. LÉMAN, L. ARNÉ et B. COIFFU
Résultats du traitement des algies faciales par un nouvel anti-convulsivant: le G 32883.
Ann.méd.-psychol. 122/I, 144(1964)

63 REMMER, H.
Beschleunigte Elimination von Pharmaka durch Enzyminduktion in den Leberzellen nach höheren Dosen von Schlafmitteln.
Verhandlung der Deutschen Gesellschaft für innere Medizin
69. Kongress 1963

64 RETT, A.
Zur Beurteilung der Wirkung von Anticonvulsiva im Kindesalter- ein klinisches und entwicklungsphysiologisches Problem.
N. Oester.Z.Kinderheilk. 7, 178-191 (1962/63)

65 SCHEIFFARTH, F., F. WEIST und L. ZICHA
Zum Nachweis von 5-Carbamyl-5 H-dibenzo(b,f)azepin im Liquor cerebrospinalis mittels Dünnschichtchromatographie.
Zschr.f.Klin.Chemie 4/2, 68-7o (1966)

66 SCHINDLER, W.
Über die Konstitutionsermittlung und Synthese eines Metaboliten von N-(γ-Dimethylaminopropyl)-iminodibenzyl-hydrochlorid (Tofranil).
Helv.chim.Acta 43, 35-42 (196o)

67 SCHINDLER, W. und H. BLATTNER
Über Derivate des Iminodibenzyls Iminostilben-Derivate
Helv.chim.Acta 44, 753-762 (1961)

68 SCHMIDT, Gg.
Ein Vakuumsublimationsgerät zur Trennung und Reinigung kleiner Substanzmengen.
Mikrochim.Acta (Wien) 1959, 4o6-418; zit. BURGDORF, W.

69 SCHMIDT, R.W.
MO-theoretische Berechnungen über Iminostilben und verwandte Verbindungen.
Helv. chim.Acta 45, 1982-1992 (1962)

7o SCHMIDT, Gg., BÖSCHE, J. und H. KEDING
Nachweis von Antiepileptika in Blut und Harn.
Aktuelle Probleme der Verkehrsmedizin 1966, Heft 3, 45-54

71 SIGWALD, J., M. BONDUELLE, C. SALLOU, PH.RAVERDY CL.PIOT et A. VAN STEENBRUGGHE
Un Nouvel Anti-Épileptique. Le carbamyl-dibenzazepine ou 5-carbamoyl-5-H-dibenzo(b,f)azépine (G.32883)
Presse Méd. 72, 2323-2324 (1964)

72 VAN SLYKE, D.D.
Ber.dtsch.chem.Ges. 43, 3170 (1910) zit. Bauer/Moll

73 SOULAIRAC, A. et CHARPENTIER, J.
Etude expérimentale de l'action d'un dérivé de l'iminostilbène, le G. 32883, sur la douleur trigéminale.
Ann.méd.-psychol. 123,: 654-655 (1965)

74 SPILLANE, J.D.
The treatment of trigeminal neuralgia: preliminary experience with "Tegretol".
Practitioner 192, 71-77 (1964)

75 STAHL, E.
Dünnschichtchromatographie.
Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer 1962

76 STEINBRECHER, W.
Die Therapie zerebraler Anfallsformen mit Tegretal.
Med.Welt 1966: 1381-1385

77 STENGER, E.G. und ROULET, F.C.
Zur Toxikologie des Antiepileptikums Tegretol
Med.exp. 11, 191-201 (1964)

78 TAYLOR, J.C.
Trigeminal neuralgia treated with G 32883. Report of a Clinical Trial.
Congr.Brit.neurol.Surg.and neurosurg.Soc.Amer., London 1963

79 TCHICALOFF, M. et PENNETTI, F.
Résultats thérapeutiques d'un nouvel antiépileptique, le Tegretol.
Schweiz.med.Wschr.93, 1664-1666(1963)

80 THEOBALD, W. und H.A. KUNZ — Zur Pharmakologie des Antiepileptikums 5-Carbamyl-5H-dibenzo(b,f) azepin. Arzneimittel-Forsch. 13, 122-125 (1963)

81 VANDERFIELD, G. — The Medical Control of Trigeminal Neuralgia: Preliminary Report On Treatment With "G 32883" Med.J.Aust. 51, 82-86 (1964)

82 VIDIC, E. — Papierchromatographische und spektralphotometrische Identifizierung barbitursäurefreier Sedativa, insbesondere von Meprobamat. Arch. Toxikol. 17, 373 (1959)

83 WAROT, P., PETIT, H. DELANDTSHEER, J.-M., ARNOTT, G. et FOURLINNIE, J.C. — Une aquisition importante dans le traitement de la névralgie faciale: le G.32883 (Tegretol) Lille méd. 9, 769-778 (1964)

84 WEIST, F. und L. ZICHA — Dünnschichtchromatographische Untersuchungen über 5-Carbamyl-5H-dibenzo(b,f)azepin in Harn und Liquor bei neuen Indikationsgebieten. Arzneimittel-Forsch. 17, 874-875 (1967)

85 ZICHA, L. und TREMEL, R. — Untersuchungen über Beeinflußbarkeit von Glucosetoleranz und Utilisation, sowie von Tolbutamidtesten durch 5-Carbamyl-5H-dibenzo(b,f) azepin (Tegretal). Med.Welt 1967: 1271-1273

Lebenslauf

Am 30. März 1942 wurde ich, Hans Rooschüz, als Sohn des praktischen Arztes Dr. med. Hans Rooschüz und seiner Ehefrau Gertrud, geb. Günther, in Gaildorf geboren.

Nach den Schuljahren in Gaildorf und Schwäbisch Hall studierte ich in Erlangen, Lübeck und Tübingen Medizin. Am 8. August 1968 legte ich in Tübingen das medizinische Staatsexamen ab.